

**DAIANE PLACIDO TORRES**

**Desenvolvimento de métodos simples e rápidos para determinação de  
mercúrio total e inorgânico em amostras biológicas por espectrometria de  
absorção atômica com vapor frio**

**Florianópolis**

**2009**

Universidade Federal de Santa Catarina  
Centro de Ciências Físicas e Matemáticas  
Departamento de Química  
Programa de Pós-graduação em Química

**Desenvolvimento de métodos simples e rápidos para determinação de mercúrio total e inorgânico em amostras biológicas por espectrometria de absorção atômica com vapor frio**

Dissertação de Mestrado

Daiane Placido Torres

Florianópolis  
2009

**Desenvolvimento de métodos simples e rápidos para determinação de mercúrio total e inorgânico em amostras biológicas por espectrometria de absorção atômica com vapor frio**

Daiane Placido Torres

Orientador: Prof. Dr. Adilson José Curtius

Co-orientadora: Vera Lúcia Azzolin Frescura Bascuñan

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do título de mestre em química analítica

Florianópolis

2009

Daiane Placido Torres

**Desenvolvimento de métodos simples e rápidos para determinação de mercúrio total e inorgânico em amostras biológicas por espectrometria de absorção atômica com vapor frio**

Esta dissertação foi julgada e aprovada para obtenção do título de **Mestre em Química** no **Programa de Pós-Graduação em Química** da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 11 de fevereiro de 2009.

---

Prof. Dr. Ademir Neves  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Adilson José Curtius  
Orientador

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vera L. A. F. Bascuñan  
Co-orientadora

---

Prof. Dr. Ivan Gonçalves de Souza  
DQ – UFSC

---

Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke  
DQ – UFSC

---

Dr. Eder Jose dos Santos  
TECPAR – PR

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Adilson, meu orientador, por acreditar em meu potencial, pela confiança em mim depositada e pelos valiosos ensinamentos.

À professora Vera, minha co-orientadora, pelos ensinamentos, apoio e carinho.

Ao meu pai, Atair, e minha mãe, Jucélia, por existirem e me dar todo o suporte necessário pra enfrentar cada dia da minha vida.

Aos meus irmãos, Luciano e Juliana, por sua graça e luz.

Aos meus colegas de laboratório Dai Paula, Daniel, Eduardo, Fábio, Fabíola, Jairo, Jessee e Luciano pela amizade e pelos momentos de descontração, inspiração e ensinamento.

Aos meus ex-colegas do laboratório Alessandra, Anderson, Lísia, Mariana, Mirela, Raúl, Rennan e Tatiana pelos ensinamentos e amizade, apesar da distância.

Às minhas grandes colegas e amigas Ingrid e Tati pelo apoio, amizade e carinho.

À minha grande amiga Laura, sua família (Sueli, Chico, Tom, Viviane, Eduardo, Érica) e amigos (Isadora e Frango) por todo o apoio, carinho e alegria que me proporcionam constantemente.

Aos meus queridos familiares, tios e tias, Salete, Fernanda (*In Memoriam*), Irlete, Elizete, Inês, Cláudia, Flor, Gorete, Vanderlei e Valdir pelo apoio e carinho.

Aos meus queridos amigos e amigas Taize, Zoraide, Pedrinho e Deise pela atenção e afeto, mesmo longe.

Ao professor Valdir por toda a abertura e disponibilidade.

A Deus, por me dar força para enfrentar e tirar boas lições de cada dia da minha vida e por me presentear de tantas formas.

Aos meus colegas de curso e a todos que de alguma forma contribuíram com meus trabalhos de iniciação científica e mestrado, e também para me tornar uma pessoa melhor.

Aos membros da banca, por aceitarem o convite e pelas suas contribuições.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	1
LISTA DE TABELAS.....	3
LISTA DE ABREVIACÕES.....	4
RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	7
1. INTRODUÇÃO.....	9
1.1. Mercúrio em amostras biológicas.....	9
1.2. Mercúrio no Brasil e no mundo.....	11
1.3. Técnica de análise.....	13
1.4. Mecanismos de redução na CVG.....	15
1.5. Preparo das amostras.....	17
2. OBJETIVOS.....	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1. Instrumentação.....	20
3.2. Tratamento do tubo de grafite com um modificador permanente.....	22
3.3. Reagentes e materiais de referência.....	22
3.4. Preparo da amostra.....	24
3.5. Procedimento analítico.....	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4.1. Determinação de mercúrio total e inorgânico em suspensões aquosas de amostras biológicas usando CV AAS e oxidação <i>in situ</i> com $\text{KMnO}_4$ .....	26
4.1.1. Avaliação do tempo de sonificação sobre o sinal de mercúrio.....	26
4.1.2. Efeito do tempo de repouso sobre o sinal de mercúrio.....	27
4.1.3. Efeito da concentração de $\text{NaBH}_4$ .....	28
4.1.4. Avaliação da concentração de $\text{KMnO}_4$ .....	30
4.1.5. Avaliação do tempo de reação com a solução de $\text{KMnO}_4$ .....	31
4.1.6. Parâmetros de mérito.....	32
4.1.7. Calibração com metilmercúrio.....	33
4.1.8. Resultados analíticos.....	35

4.2. Determinação de mercúrio total e inorgânico em amostras biológicas usando CV AAS após o pré-tratamento com TMAH ou microondas.....	37
4.2.1. Efeito da concentração de $\text{NaBH}_4$ .....	38
4.2.2. Tratamento da amostra com TMAH.....	40
4.2.3. Digestão ácida dos CRM assistida por microondas.....	41
4.2.4. Tempo de repouso para amostras em TMAH.....	42
4.2.5. Volume de amostra.....	43
4.2.6. Especificação.....	44
4.2.7. Parâmetros de mérito.....	45
4.2.8. Resultados analíticos.....	46
5. CONCLUSÕES.....	50
6. REFERÊNCIAS.....	51
7. ANEXOS: Artigos.....	56

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Sistema MHS-15 de geração química de vapor com atomizador de quartzo.....	20
<b>Figura 2</b> – Efeito do tempo de sonificação sobre o sinal de absorvância normalizado para mercúrio a partir das suspensões das amostras preparadas em água. (—●—) DOLT-3 3,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ , (—▲—) BCR 186 3,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ e (—■—) TORT-2 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ .....	26
<b>Figura 3</b> – Efeito do tempo de repouso sobre o sinal de absorvância normalizado para mercúrio a partir das suspensões das amostras preparadas em água. (—■—) DOLT-3 3,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ , (—●—) BCR 186 3,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e (—▲—) TORT-2 1,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ .....	27
<b>Figura 4</b> – Efeito da concentração de $\text{NaBH}_4$ sobre o sinal de absorvância para suspensões de amostra e uma solução padrão preparadas em água. (—■—) DOLT-3 8,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ , (—●—) BCR 186 6,8 $\mu\text{g L}^{-1}$ e (—▲—) $\text{Hg}^{2+}$ 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ .....	29
<b>Figura 5</b> – Efeito da concentração de $\text{KMnO}_4$ sobre o sinal de absorvância para mercúrio nas suspensões de amostra e solução padrão preparadas em água. (—●—) DOLT-3 13,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ , (—■—) BCR 186 7,9 $\mu\text{g L}^{-1}$ e (—▲—) $\text{Hg}^{2+}$ 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ .....	31
<b>Figura 6</b> – Efeito do tempo de reação com a solução de $\text{KMnO}_4$ 2,0% m/v sobre o sinal de absorvância para mercúrio nas suspensões de amostra e solução padrão preparadas em água. (—●—) DOLT-3 14,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ , (—■—) BCR 186 6,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e (—▲—) $\text{Hg}^{2+}$ 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ .....	32
<b>Figura 7</b> – Avaliação do meio de preparo da solução padrão de metilmercúrio. (—■—) n-propanol e (—▲—) ácido clorídrico 0,6 $\text{mol L}^{-1}$ .....	34
<b>Figura 8</b> – Efeito da concentração de $\text{NaBH}_4$ sobre o sinal de absorvância para as soluções de amostra digeridas com ácido em forno de microondas e uma solução padrão em meio ácido. (—■—) DOLT-3 13,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ , (—●—) BCR 186 7,9 $\mu\text{g L}^{-1}$ e (—▲—) $\text{Hg}^{2+}$ 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ .....	38
<b>Figura 9</b> – Efeito da concentração de $\text{NaBH}_4$ sobre o sinal de absorvância para as suspensões de CRM tratados com TMAH e uma solução padrão em TMAH obtido por CV-GF AAS. (—△—) DOLT-2 10,8 $\mu\text{g L}^{-1}$ , (—□—) BCR 186 9,9 $\mu\text{g L}^{-1}$ , (—○—) GBW 9101 10,8 $\mu\text{g L}^{-1}$ e (—▽—) $\text{Hg}^{2+}$ 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ .....	39



**Figura 10** – Efeito do volume de TMAH sobre o sinal de absorvância para as suspensões de CRM tratados com TMAH obtido por CV-GF AAS. (—△—) DOLT-2  $8,6 \mu\text{g L}^{-1}$ , (—□—) BCR 186  $7,9 \mu\text{g L}^{-1}$  e (—○—) GBW 9101  $8,6 \mu\text{g L}^{-1}$ .....40

**Figura 11** – Efeito da concentração de HCl sobre o sinal de absorvância para as suspensões de CRM tratados com TMAH e uma solução padrão em TMAH obtido por CV-GF AAS. (—△—) DOLT-2  $10,8 \mu\text{g L}^{-1}$ , (—□—) BCR 186  $9,9 \mu\text{g L}^{-1}$ , (—○—) GBW 9101  $10,8 \mu\text{g L}^{-1}$  e (—▽—)  $\text{Hg}^{2+}$   $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$ .....41

**Figura 12** – Efeito do tempo de repouso sobre o sinal de absorvância normalizado para mercúrio a partir das suspensões de CRM em TMAH. (—▲—) DOLT-3  $7,2 \mu\text{g L}^{-1}$ , (—●—) BCR 186  $6,0 \mu\text{g L}^{-1}$  e (—■—) TORT-2  $1,3 \mu\text{g L}^{-1}$ .....43

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Programa de temperatura do forno de grafite para determinação de mercúrio total por CV-GF AAS.....	22
<b>Tabela 2</b> – Figuras de mérito para a determinação de Hg total e inorgânico em solução padrão aquosa com e sem $\text{KMnO}_4$ 2,0% m/v por CV AAS.....	33
<b>Tabela 3</b> – Figuras de mérito para a determinação de mercúrio a partir de soluções padrão de metilmercúrio em HCl e n-propanol com $\text{KMnO}_4$ 2,0% m/v, por CV AAS.....	34
<b>Tabela 4</b> – Resultados analíticos para a determinação de Hg total (com adição de $\text{KMnO}_4$ ), inorgânico (sem adição de $\text{KMnO}_4$ ) e metilmercúrio (obtido pela diferença entre Hg total e $\text{Hg}^{2+}$ ) em CRM preparados na forma de suspensão aquosa por CV AAS. Valores obtidos (média $\pm$ limite de confiança) em $\mu\text{g g}^{-1}$ ; n = 3.....	36
<b>Tabela 5</b> – Figuras de mérito para a determinação de Hg total e inorgânico por CV AAS com e sem o aquecimento do tubo de quartzo.....	46
<b>Tabela 6</b> – Resultados analíticos para a determinação de Hg total (amostras digeridas em forno de microondas), inorgânico (amostras em TMAH) e metilmercúrio (obtido pela diferença entre Hg total e $\text{Hg}^{2+}$ ) em CRM por CV AAS. Valores obtidos (média $\pm$ limite de confiança) em $\mu\text{g g}^{-1}$ ; n = 3.....	48
<b>Tabela 7</b> – Resultados analíticos para a determinação de Hg total (com aquecimento do tubo de quartzo), inorgânico (com o tubo de quartzo a temperatura ambiente) e metilmercúrio (obtido pela diferença entre Hg total e $\text{Hg}^{2+}$ ) em CRM tratados com TMAH por CV AAS. Valores obtidos (média $\pm$ desvio padrão) em $\mu\text{g g}^{-1}$ ; n = 3.....	49

## LISTA DE ABREVIACÕES

AAS – Espectrometria de absorção atômica (Atomic absorption spectrometry)

CV – Vapor frio (Cold vapor)

CV AAS – Espectrometria de absorção atômica com vapor frio (Cold vapor atomic absorption spectrometry)

CVG – Geração química de vapor (Chemical vapor generation)

CV-GF AAS – Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite após geração de vapor frio (Cold vapor graphite furnace atomic absorption spectrometry)

CRM – Material de referência certificada (Certified reference material)

GC – Cromatografia gasosa (Gas chromatography)

GC-FAPES – Espectrometria de emissão em plasma com atomização em forno acoplada a cromatografia gasosa (Gas chromatography with furnace atomization plasma emission spectrometric detection)

ETV-ICP-MS – Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado e vaporização eletrotérmica (Electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry)

FI-CV AAS – Espectrometria de absorção atômica com vapor frio e injeção em fluxo (Flow injection cold vapor atomic absorption spectrometry)

HG – Geração de hidreto (Hydride generation)

HG AAS – Espectrometria de absorção atômica com geração de hidreto (Hydride generation atomic absorption spectrometry)

ICP-OES – Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (Inductively coupled plasma emission spectrometry)

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

MIP-OES – Espectrometria de emissão ótica com plasma induzido por microondas (Microwave induced plasma optical emission spectrometry)

PP – Polipropileno

QTA – Atomizador de quartzo (Quartz tube atomizer)

RSD – Desvio padrão relativo (Relative standard deviation)

TMAH – Hidróxido de tetrametilamônio (Tetramethylammonium hydroxide)

## RESUMO

Foram desenvolvidos três procedimentos simples, rápidos e confiáveis para a determinação de mercúrio total e inorgânico e, indiretamente, metilmercúrio, em amostras biológicas certificadas de referência por espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio (CV AAS) após oxidação da amostra com  $\text{KMnO}_4$ , ou tratamento da amostra com hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) ou digestão ácida da amostra assistida por microondas.

O método de CV AAS empregando  $\text{KMnO}_4$  como agente oxidante para determinação das espécies de mercúrio em materiais certificados de referência (CRM) biológicos, diretamente a partir de suspensão preparada em água, não requer nenhum tempo de repouso ou aquecimento da mesma, sendo as amostras simplesmente misturadas com água podendo a medida ser realizada imediatamente. Para a determinação de mercúrio inorgânico, nenhuma etapa adicional é necessária. Para a determinação de mercúrio total, as amostras foram oxidadas previamente com uma solução de  $\text{KMnO}_4$  2,0% m/v por dois minutos. Depois disso, a medida pode ser realizada similarmente àquela para a determinação de mercúrio inorgânico. A concentração de mercúrio orgânico pode ser calculada como a diferença entre mercúrio total e inorgânico. A maior vantagem deste procedimento é que somente um mínimo de reagentes e etapas de manipulação da amostra são requeridos, o que permanece como um pré-requisito para análises de rotina, particularmente para a determinação de mercúrio e suas espécies. Os resultados foram concordantes com os valores certificados ou próximos aos valores informados a um nível de confiança de 95% para os materiais de referência investigados. O desvio padrão relativo foi menor que 7,0% para a maioria dos CRM. Os limites de detecção para a amostra foram determinados como 0,020 e 0,016  $\mu\text{g g}^{-1}$  para mercúrio inorgânico e total, respectivamente.

O método de CV AAS empregando tratamento da amostra com TMAH a temperatura ambiente foi empregado para a determinação de mercúrio inorgânico mantendo-se o tubo de quartzo a temperatura ambiente. A concentração de mercúrio total foi medida pela mesma técnica e após o mesmo tratamento da amostra, sendo, no entanto o tubo de quartzo aquecido em uma chama de ar/acetileno, ou depois da digestão ácida dos CRM em forno de microondas. Como no método anterior, mercúrio orgânico foi obtido pela diferença. As concentrações obtidas por estes métodos também concordaram com os

valores certificados de acordo com o teste  $t$  para um nível de confiança de 95%. Os desvios padrão relativos foram menores que 3,0% para os CRM digeridos em microondas e menores do que 6,0% para os CRM tratados com TMAH, com o tubo de quartzo mantido à temperatura ambiente. Os limites de detecção nas amostras foram 0,021 e 0,041  $\mu\text{g g}^{-1}$  para Hg inorgânico e total, respectivamente, já que a massa de amostra para mercúrio total nos CRM digeridos foi metade daquela para a determinação de mercúrio inorgânico. Os desvios padrão relativos para os CRM tratados com TMAH com o tubo de quartzo aquecido na chama de ar/acetileno foram, em geral, menores que 10,0%. Neste caso, o limite de detecção para Hg total nas amostras foi de 0,13  $\mu\text{g g}^{-1}$ .

Simplicidade, alta eficiência, sem o uso de técnicas cromatográficas, e não utilização de soluções padrão de metilmercúrio são algumas das qualidades dos métodos propostos, tornando-os adequados para análise rotineira de especiação de mercúrio em amostras biológicas. O procedimento proposto que emprega tratamento dos CRM com água e oxidação *in situ* com permanganato de potássio se mostrou rápido, seguro e ambientalmente correto. Além disso, ainda minimiza as chances de contaminação da amostra e pode ser facilmente aplicável à análise de rotina de materiais biológicos. Por outro lado, o procedimento de pré-tratamento da amostra com TMAH possibilita uma solubilização simples, segura, reprodutiva e efetiva. A determinação de mercúrio total com o tubo de quartzo a temperatura ambiente, depois da digestão ácida dos CRM em microondas, garante um LD similar àquele obtido para  $\text{Hg}^{2+}$ . Além disso, a etapa de medida de Hg total nos CRM digeridos é mais rápida do que aquela com os mesmos tratados com TMAH com o tubo de quartzo aquecido na chama de ar/acetileno.

## ABSTRACT

Three simple, rapid and reliable procedures for the determination of total and inorganic mercury and, indirectly, methylmercury, in certified reference biological samples by cold vapor atomic absorption spectrometry (CV AAS) after sample oxidation with  $\text{KMnO}_4$ , or sample treatment with tetramethylammonium hydroxide (TMAH) or microwave-assisted acid digestion of the sample have been developed.

The method using CV AAS employing  $\text{KMnO}_4$  as oxidizing agent for the determination of mercury species in biological certified reference materials (CRM) directly from slurries prepared in water does not require any standing time or heating of the slurry. Samples are simply mixed with water and measurement can be carried out immediately. For inorganic mercury determination, no additional preparation is required. For total mercury determination the samples have to be previously oxidized with a 2.0% m/v  $\text{KMnO}_4$  solution for two minutes. After that, the measurement can be carried out similarly to that for inorganic mercury determination. The organic mercury concentration can be calculated as the difference between total and inorganic mercury. The greatest advantage of this method is that only a minimum of reagents and sample handling steps are required, which stands as a prerequisite for routine analysis, particularly for the determination of mercury and its species. The results were in agreement with the certified values at a confidence level of 95% or close to the informed values for the reference materials investigated. The relative standard deviation was less than 7.0% for most of the reference materials investigated. The limits of detection in the sample were determined as 0.020 and 0.016  $\mu\text{g g}^{-1}$  for inorganic and total mercury, respectively.

The method using CV AAS employing sample treatment with TMAH at room temperature has been employed for the inorganic mercury determination, keeping the quartz tube at room temperature. Total mercury is measured by the same technique and after the same sample treatment but heating of the quartz tube in an air/acetylene flame, or after the CRM acid digestion in a microwave oven. As in the previous method, organic mercury is obtained by difference. The concentrations obtained by this method also agree with the certified values according to *t*-test at a 95% confidence level. The relative standard deviations were lower than 3.0% for digested CRM and lower than 6.0% for those after treatment with TMAH, being the quartz tube kept at room temperature. The limits of

detection in the samples were 0.021 and 0.041  $\mu\text{g g}^{-1}$  for inorganic and total Hg, respectively, since the sample mass for total mercury in the digested CRM was half of that for inorganic mercury determination. The relative standard deviations for the CRM treated with TMAH being the quartz tube heated in an air-acetylene flame were, in general, lower than 10.0%. In this case, the limit of detection for total Hg in the samples was 0.13  $\mu\text{g g}^{-1}$ .

Simplicity, high efficiency, without using chromatographic techniques, and not requiring the use of methylmercury standard solutions, are some of the qualities of the proposed methods, which make them adequate for mercury speciation analysis in biological samples. The proposed procedure employing CRM treatment with water and *in situ* oxidation with potassium permanganate has proved to be fast, safe and environmentally friendly. Moreover, it still minimizes sample contamination risk and it can be easily applicable to routine analysis of biological samples. On the other hand, the procedure employing sample pretreatment with TMAH has led to a simple, safe, reproducible and effective solubilization method for biological samples. The determination of total mercury at room temperature, after acid digestion of the CRM in microwave oven, assures a limit of detection similar to that obtained for  $\text{Hg}^{2+}$ . In addition, the measurement step of total Hg in the microwave digested CRM is faster than that with the CRM treated with TMAH being the quartz tube heated in an air-acetylene flame.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Mercúrio em amostras biológicas

Mercúrio é um poluente global identificado como altamente tóxico, além ser acumulativo e persistente no meio ambiente. As várias espécies de mercúrio diferem grandemente em suas propriedades bio-físico-químicas tal como toxicidade, solubilidade, e taxa de bioacumulação pelos organismos. O principal caminho para a exposição humana é o consumo de peixe contaminado e outros frutos do mar que bioacumulam mercúrio orgânico. Esse processo depende da formação de compostos orgânicos de mercúrio a partir do mercúrio inorgânico em ecossistemas aquáticos. As espécies de mercúrio orgânicas, altamente tóxicas e solúveis em gordura, tendem a se acumular em tecidos de peixe, de onde elas podem entrar na cadeia alimentar humana. Mercúrio inorgânico ( $\text{Hg}^{2+}$ ) e metilmercúrio ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ) são as duas principais espécies geralmente encontradas em amostras biológicas. Portanto, a análise de amostras somente para determinação da quantidade de mercúrio total não é conclusiva, porque fornece somente uma informação parcial sobre seu impacto na saúde humana e no meio ambiente.<sup>1,2</sup> A determinação de mercúrio total e suas espécies em amostras biológicas requer consideração cuidadosa do pré-tratamento da amostra.<sup>3</sup> Um método de preparo de amostra rápido e simples tem sido reportado, usando hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) para solubilizar amostras biológicas a fim de se determinar mercúrio e outros analitos.<sup>4-8</sup> A amostragem em suspensão é um método de preparo de amostra particularmente atrativo pois combina as vantagens da amostragem líquida e sólida. Desta forma, as amostras são facilmente preparadas, não requerendo um pré-tratamento químico agressivo, são menos susceptíveis a contaminação e perda do analito antes da análise e, geralmente, padrões aquosos podem ser usados para a calibração.<sup>9,10</sup> Um outro método simples de preparo de amostra na forma de suspensão, embora não tão rápido, consiste no pré-tratamento com ácido fórmico para solubilização de amostra biológica, o qual tem sido usado com sucesso por alguns autores.<sup>11,12</sup>

No ambiente marinho, a distribuição e especiação de Hg são de interesse considerável já que pode ocorrer biometilação e subsequente bioconcentração na cadeia alimentar. O mercúrio está predominantemente presente como metilmercúrio nas amostras biológicas marinhas. Ferramentas para análise de especiação envolvem procedimentos de



preparo de amostra mais brandos para preservar a integridade de quaisquer compostos organomercúricos.<sup>13</sup> Digestão de matrizes orgânicas e inorgânicas é um estágio crítico na determinação de elementos traço, já que pode determinar a precisão e exatidão dos resultados. Uma grande variedade de combinação de ácidos fortes, oxidantes, radiação ultravioleta, temperatura e pressão elevadas têm sido usadas e recomendadas.<sup>14</sup> A extração de espécies de mercúrio a partir da matriz da amostra é reconhecidamente uma das etapas mais críticas de um método analítico. A principal preocupação na extração deve ser (1) perda de mercúrio em elevadas temperaturas, usadas em procedimentos de digestão, (2) interconversão de espécies a partir da coleta das amostras, (3) contaminação da amostra e (4) a necessidade de usar grandes quantidades de reagentes durante o pré-tratamento, o que aumenta o valor do branco e empobrece o limite de detecção. O método de pré-tratamento da amostra deve permitir solubilização das espécies orgânicas a partir da amostra de interesse, sem quebrar a ligação C-Hg.<sup>1</sup>

Subtração da fração de mercúrio inorgânico a partir da quantidade de mercúrio total é um método indireto comum para a determinação das espécies de mercúrio orgânicas encontrado na literatura. Sem qualquer procedimento de digestão prévio, mercúrio inorgânico pode ser seletivamente determinado.<sup>4,15</sup> Várias técnicas hifenadas seletivas têm sido aplicadas para a análise de especiação de mercúrio ao nível de traço, a maioria delas combinando separação cromatográfica e determinação espectrométrica.<sup>16</sup> Entretanto, o uso de instrumentação analítica sofisticada, embora frequentemente associada à boa exatidão e sensibilidade, é caracterizada por procedimentos analíticos trabalhosos e caros, o que frequentemente adiciona complexidade à tarefa de análise de especiação em matrizes biológicas. Embora muita pesquisa seja dirigida para melhorar a instrumentação analítica, a procura por métodos que buscam simplificar o preparo da amostra e a própria análise pode ser igualmente – se não mais – valiosa, pela redução do custo e complexidade do procedimento.<sup>11</sup> Duas rotas principais são disponíveis para diferenciar entre espécies orgânicas e inorgânicas. Uma faz o uso de técnicas cromatográficas, principalmente cromatografia gasosa, sendo possível distinguir todas as espécies organomercuriais, embora mercúrio inorgânico não possa ser determinado diretamente. A segunda possibilidade é redução seletiva, que se baseia nos diferentes comportamentos de redução do mercúrio orgânico e inorgânico na presença de redutores diferentes. A redução seletiva não permite a identificação das diferentes espécies orgânicas, mas pode diferenciar compostos de

alquilmercúrio do mercúrio inorgânico. Metil, etil e fenilmercúrio são os organomercuriais mais comumente reportados em amostras biológicas marinhas.<sup>5,17,18</sup>

A espectrometria de absorção atômica com vapor frio (CV AAS) é a técnica mais largamente usada para a determinação de mercúrio por causa da sua alta sensibilidade, ausência quase absoluta de interferências espectrais, custo operacional relativamente baixo e simplicidade. Entretanto, a determinação de mercúrio total por CV AAS geralmente requer um pré-tratamento da amostra, a fim de atingir decomposição completa da matéria orgânica e produzir, quantitativamente, uma espécie de mercúrio iônica, a qual pode ser posteriormente reduzida a mercúrio elementar.<sup>14</sup>

## **1.2. Mercúrio no Brasil e no mundo**

Um dos casos mais conhecidos de contaminação por mercúrio ocorreu em 1953, em Minamata, no Japão. A contaminação da Baía de Minamata por metilmercúrio ficou conhecida como a “doença de Minamata”, quando a Chisso Fertilizer C. Ltd. (uma das maiores indústrias do Japão, que produzia fertilizantes químicos, resinas sintéticas, plásticos e compostos químicos) produzia o metilmercúrio como um subproduto do processo de produção do acetaldeído. Os resíduos eram despejados nas águas da baía e a população de Minamata alimentava-se de peixes provenientes desta baía. Em pacientes expostos, após cinco anos da ocorrência da contaminação, foram encontradas concentrações de mercúrio extremamente elevadas no cabelo, variando de 2,46 a 705 mg/kg. Em 1960, o nível de mercúrio no lodo próximo ao canal de drenagem da indústria apresentava um valor de 2010 mg/kg em peso seco. Nos animais marinhos os níveis de mercúrio também foram elevados: 35,7 mg/kg nos caranguejos e 5,61 mg/kg nas ostras. Ficou oficialmente reconhecido que 2252 pessoas foram diretamente contaminadas pelo metilmercúrio, sendo que 1043 óbitos ocorreram e um total de 12127 pessoas reivindicou estar doente.<sup>19,20</sup>

Na década de 70, no Iraque, Paquistão, Gana e Guatemala ocorreram vários casos de contaminação de agricultores e seus familiares, que utilizavam grãos tratados com fungicidas a base de metil e etilmercúrio na confecção de pão caseiro. No caso particular do Iraque, mais de 6900 pessoas foram hospitalizadas e, pelo menos, 459 morreram. Em 1969, nos Estados Unidos, também houve uma intoxicação resultante da ingestão de carne de

porcos alimentados com grãos tratados com fungicidas organometálicos. A literatura apresenta vários casos de contaminação com mercúrio que vão desde a quebra de termômetros em hospitais e lares até a contaminação de lagos e rios por atividades industriais, principalmente de indústrias de cloro-álcali. Um caso recente ocorreu em Sorocaba, em SP, na Rede Ferroviária Federal S. A. quando um vazamento de mercúrio contaminou dez adolescentes com idades entre 13 e 17 anos. O mercúrio metálico era proveniente de um reator elétrico desativado desmontado por saqueadores de sucata de cobre.<sup>19</sup>

No Brasil, entretanto, a região mais afetada por contaminação de mercúrio é a amazônica. A contaminação se dá devido à presença de minas de ouro nessa região. No processo de mineração de ouro, uma enorme quantidade de mercúrio metálico tem sido usada e liberada de modo abusivo no ecossistema local desde meados da década de 70 até meados dos anos 90. Estima-se que cerca de 100 toneladas de Hg tenham sido emitidas anualmente (uma para cada tonelada de ouro), das quais 45% foram despejadas nos rios e 55% na atmosfera. Tratando-se de mercúrio, existe a possibilidade de causar dois tipos de danos à saúde na bacia do rio Amazonas: envenenamento ocupacional por Hg inorgânico pela inalação direta de vapor de Hg durante os processos de queima e requeima da amálgama Hg-Au, ou uma parte do Hg descartado no rio é metilado e, em seguida, bioacumulado a um nível significativo em peixe. Assim, as pessoas que vivem ao longo do rio e dependem dos produtos ribeirinhos são facilmente expostas a metilmercúrio, que pode atingir níveis tóxicos, através do consumo repetido de peixes contaminados.<sup>21-23</sup>

Os mineradores de ouro usam Hg para recuperar o ouro devido a uma de suas propriedades: capacidade de formar amálgamas com outros metais. A alta densidade (assim como a do ouro) tende a concentrá-los nas frações de sedimentos mais pesadas. A alta volatilidade permite a separação de Hg e Au por volatilização do Hg, quando se queima a amálgama. Esse processo é muito atrativo devido à sua simplicidade e baixo custo, e tem sido largamente usado na bacia Amazônica brasileira e em outros países da América Latina (Bolívia, Peru, Colômbia e Venezuela), bem como na Ásia e África.<sup>24</sup> Desde os anos 80, o Brasil alcançou o primeiro lugar na produção de ouro na América do Sul com uma produção anual de 100 a 200 toneladas, com cerca de 90% vinda de minas informais ou “garimpos”.<sup>25</sup> A poluição ambiental por mercúrio na Amazônia, que se origina do mercúrio metálico, é bastante diferente daquela experimentada no passado no Japão e Iraque, as

quais se originaram do metilmercúrio. Em áreas de mineração de ouro, envenenamento ocupacional devido ao mercúrio inorgânico pode ocorrer entre os mineradores, ao passo que as pessoas que vivem rio abaixo da mineração de ouro, podem estar expostas a mercúrio inorgânico e metilmercúrio. Portanto, a especiação de mercúrio é essencial no levantamento topográfico do comportamento químico do mercúrio nos ecossistemas.<sup>26</sup>

### 1.3.Técnica de análise

A geração química de vapor (CVG) é uma técnica analítica bastante sensível na qual os analitos são vaporizados na forma de átomos ou moléculas gasosos através de uma reação química à temperatura ambiente e, posteriormente, transportados para um atomizador ou cela de absorção aquecida ou não. A geração química de vapor pode ocorrer através da técnica de geração de hidreto (HG) para determinação de elementos como As, Bi, Pb, Sb, Se, e Te, técnica de vapor frio (CV), para determinação de Hg e Cd, etilação, para determinação de Pb e Hg, e geração de carbonil, para determinação de Ni. O método utilizado neste trabalho foi a técnica de vapor frio, na qual o mercúrio presente na amostra forma mercúrio metálico, uma espécie bastante volátil, ao reagir em meio ácido com o agente redutor tetraidroborato de sódio,  $\text{NaBH}_4$ .<sup>27</sup> A espectrometria de absorção atômica com geração química de vapor (CVG AAS) é um método analítico instrumental sensível e convencional, amplamente usado, pois:

- Garante uma eficiência de transporte de até 100% do frasco reacional ao atomizador,
- O vapor formado é homogêneo,
- Permite a separação do analito a partir da matriz potencialmente interferente,
- Utilização de um grande volume de solução,
- Obtenção de baixos LD, também devido à possível pré-concentração *in situ* do analito,
- Permite estudos de especiação,
- Pode ser acoplada a diferentes técnicas (AAS, ICP-OES, ICP-MS).

Entretanto, a geração química de vapor apresenta algumas desvantagens, uma vez que:

- A primeira etapa é uma reação química, sujeita a interferências,

- O estado de oxidação e forma (composto) do analito são críticos,
- Concomitantes da solução podem impedir a geração ou liberação do vapor,
- O pH da solução e as concentrações dos reagentes podem ser críticos,
- Cinética da reação e liberação podem ser afetadas por fatores como viscosidade e volume,
- O mercúrio é particularmente sensível a reações de troca, o que pode causar perdas e contaminação.

Os vapores gerados pela reação com o redutor podem ser alternativamente coletados em uma superfície previamente tratada com um modificador químico. Para a determinação de mercúrio um método bastante convencional é a retenção dos seus vapores em um tubo de grafite tratado com Au, por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite após geração de vapor frio (CV-GF AAS).<sup>2,4</sup> No entanto, apesar de melhoras significativas na instrumentação, a determinação de metilmercúrio é muitas vezes prejudicada por problemas relativos a recuperações não-quantitativas e questões sobre a possibilidade de formação e interconversão de metilmercúrio durante as etapas de preparo da amostra e separação. A geração de vapor frio diretamente de alíquotas de amostras preparadas na forma de suspensão tem se apresentado como uma alternativa simples e eficaz, pois evita que se utilizem os tratamentos intensivos e tediosos para o preparo das amostras, sujeitos à perda do analito ou contaminação das mesmas. Especificação de compostos de mercúrio em amostras biológicas e ambientais requer procedimentos analíticos rigorosos em cada estágio, coleta da amostra, tratamento ou medida.<sup>11,19,28-30</sup>

Novas formas de geração e introdução de vapores de espécies voláteis empregando espectrometria atômica vêm sendo investigadas nos últimos anos. Dentre essas, pode-se citar o uso de ferramentas químicas e físicas para a redução seletiva dos analitos, como no trabalho de Monteiro e colaboradores,<sup>31</sup> em que  $\text{NaBH}_4$  0,01% m/v é usado para reduzir  $\text{Hg}^{2+}$  e o mesmo redutor, na concentração de 0,3% m/v, é empregado para reduzir metilmercúrio na presença de cloreto de ferro(III). Alternativamente, métodos fotoquímicos de geração de vapor também estão sendo investigados por vários grupos no mundo, bem como a geração de vapor frio promovida por ultra-som para a determinação de mercúrio,<sup>32,33</sup> geração de vapor frio a partir de luz visível e ultravioleta para especificação de

mercúrio,<sup>3,34</sup> geração de vapor assistida por radiação ultravioleta para determinação de Se,<sup>35</sup> e de vários outros elementos voláteis, metais de transição, metais nobres e não metais.<sup>36</sup>

#### 1.4. Mecanismos de redução na CVG

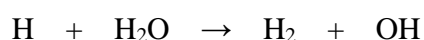
A geração química de vapor usando reação em fase aquosa de tetrahidroborato é, atualmente, um dos métodos mais populares para a determinação de As, Sb, Bi, Se, Te, Ge, Pb, e Hg por AAS e outras técnicas de espectrometria atômica.<sup>4,10,31</sup> O mecanismo da CVG tem sido alvo de relativamente poucas investigações. A primeira hipótese do mecanismo da geração de hidreto foi postulada por Robbins e Caruso em 1979,<sup>37</sup> e é conhecida como mecanismo do “hidrogênio nascente”. Eles argumentaram que a espécie ativa no processo de derivatização/redução é o hidrogênio atômico, ou o “hidrogênio nascente”, o qual é pensado ser formado durante a hidrólise ácida do tetrahidroborato, ou seja:



Com o átomo de hidrogênio sendo responsável pela derivatização do elemento ao hidreto:

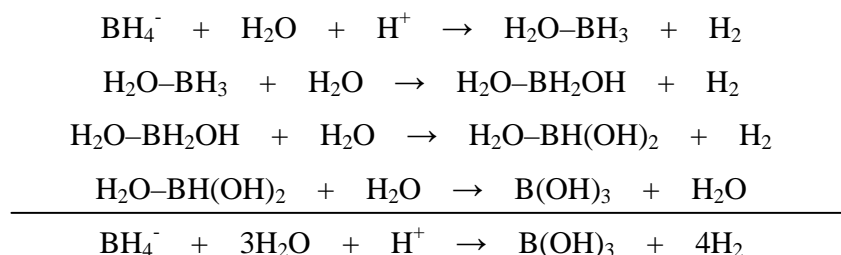


Onde  $m$  representa o estado de oxidação do analito e  $n$  o número de coordenação do hidreto. O excesso de hidrogênio atômico forma hidrogênio molecular, o qual é um dos produtos finais da hidrólise catalisada por ácido do tetrahidroborato, através de reações do tipo:

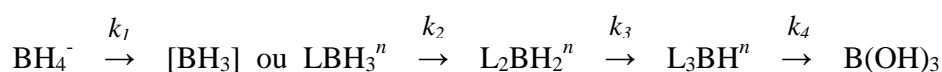


O mecanismo de CVG tem sido recentemente investigado e discutido de acordo com propriedades fundamentais do tetrahidroborato e complexos borano reportados na literatura. De acordo com evidências experimentais coletadas a partir de estudos sobre troca de deutério – hidrogênio realizados por D’Ulivo e colaboradores,<sup>38</sup> a formação de hidrogênio atômico não é viável pela hidrólise ácida do tetrahidroborato ou outros complexos borano. Hidrogênio molecular e espécies de hidrobórano, não hidrogênio atômico, são formados como intermediários de reação durante a hidrólise do tetrahidroborato. Além disso, experimentos com NaBD<sub>4</sub> e outros reagentes deuterados

( $D_3O^+$  em  $D_2O$ , NaOD) indicam que a reação de geração de vapor em meio ácido é devida à transferência direta de hidrogênio ligado ao boro durante a geração de  $AsH_3$ ,  $SbH_3$  e  $CH_3HgH$ . Essa evidência apresenta um argumento sólido contra o mecanismo do hidrogênio nascente. O mecanismo de hidrólise do tetrahidroborato está estritamente relacionado com o mecanismo da CVG. A decomposição do tetrahidroborato em solução aquosa pura pode ser representada como segue no esquema abaixo:



As reações acima se referem à hidrólise em meio no qual os únicos ligantes possíveis são  $H_2O$  e  $OH^-$ . Quanto a CVG, uma ou mais espécies de hidrobórano formadas durante a hidrólise do tetrahidroborato são as espécies reativas efetivas para  $Hg(II)$ ,  $As(III)$ ,  $Sb(III)$ ,  $Bi(III)$ ,  $Se(IV)$ ,  $Te(IV)$  e  $Sn(IV)$ . Em outro trabalho de D'Ulivo e colaboradores,<sup>39</sup> foi demonstrado que mercúrio é o elemento mais reativo da família dos elementos que sofrem CVG. Ele pode ser reduzido em condições alcalinas em nível de nanomolar, ou usando quantidades micromolares de tetrahidroborato em condições ácidas. Os resultados indicaram que as espécies de mercúrio,  $Hg^{2+}$ , seus complexos com cloreto, ou ambos, são muito reativos em relação a todos os intermediários hidrobórano possíveis formados pela decomposição do tetrahidroborato, conforme reação abaixo.



Onde L pode ser um ou mais grupos entre  $H_2O$ ,  $OH^-$  e  $Cl^-$ , e  $n$  é a carga, a qual pode ser +1, 0, ou -1, dependendo das características de L. Sob as condições de reação tipicamente empregadas em CVG (meio de HCl,  $pH < 2$  e temperatura ambiente), a taxa de hidrólise ácida das espécies de hidrobórano, em geral, parece seguir a ordem  $k_1 < k_2 < k_3 < k_4$ .

### 1.5. Preparo das amostras

Um pré-requisito importante para a determinação bem sucedida de mercúrio em amostras biológicas é que o mercúrio esteja presente no estado de oxidação 2+ para que possa ser reduzido a mercúrio elementar ( $\text{Hg}^0$ ) na presença de um agente redutor adequado. A quantificação pode então ser realizada pelo transporte do vapor de mercúrio formado para dentro de um atomizador de quartzo para determinação por espectrometria de absorção atômica. Compostos organomercúricos não são, entretanto, reduzidos a mercúrio elementar por  $\text{SnCl}_2$  ou, não completamente por  $\text{NaBH}_4$ .<sup>31</sup> A quantificação nestas condições é impossível, a menos que um pré-tratamento adequado da amostra seja realizado. Para a análise de amostras biológicas por CV AAS, o pré-tratamento deve atingir dois objetivos. Primeiro, a matéria orgânica na amostra deve ser suficientemente oxidada para liberar as espécies de mercúrio a partir da matriz da amostra, e segundo, o mercúrio liberado deve ser completamente oxidado a  $\text{Hg}^{2+}$ . Uma variedade de combinações de ácidos fortes ( $\text{HCl}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{HNO}_3$ ), oxidantes ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{KMnO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ,  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ), temperaturas elevadas, radiação ultravioleta e exposição a microondas têm sido usadas e recomendadas.<sup>4,40-43</sup>

Hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) ou  $\text{N}(\text{CH}_3)_4\text{OH}$ , uma base forte e solúvel em água, é um agente alternativo para o preparo de amostras biológicas. Recentemente, TMAH tem sido usado como solubilizador de tecidos para várias amostras biológicas antes da análise para a determinação de elementos traço por MIP-OES,<sup>8</sup> FI-CV AAS,<sup>5,6</sup> ETV-ICP-MS,<sup>13</sup> GC-FAPES,<sup>44</sup> CV AAS usando diferentes temperaturas no tubo de quartzo<sup>4,15</sup> e CV/HG AAS e CV/HG ICP-OES.<sup>45</sup>

A determinação de mercúrio em amostras sólidas geralmente envolve várias etapas analíticas, incluindo extração, derivatização (quando GC está envolvida), separação e detecção.<sup>46</sup> O método analítico apropriado depende da natureza da amostra e da concentração de mercúrio. Entretanto, os compartimentos mais críticos para especiação ainda estão ligados à fase sólida – biota e solo/sedimento. Nos procedimentos de extração de espécies organomercúricas mais comuns, a partir de amostras ambientais, são usadas extração ácida (geralmente combinada com extração de solvente), destilação e extração alcalina. Neste sentido, dois tópicos conflitantes precisam ser tratados: obter uma recuperação adequada e prevenir perdas de espécies, especialmente devido à destruição dos compostos.<sup>29</sup> O uso de microondas tem sido estabelecido durante a última década como



eficiente auxiliar na digestão ácida de vários tipos de amostras para a determinação de elementos traço. A possibilidade de perder mercúrio através de volatilização durante a digestão da amostra em temperatura alta, impede o uso dos procedimentos de fusão ou calcinação. O uso de um frasco de Teflon selado, aquecido a alta temperatura, pode prevenir perdas de mercúrio volátil. As principais vantagens da digestão em microondas usando frasco fechado são que o tempo de digestão é significativamente reduzido, e a contaminação da amostra e as perdas do analito por volatilização também são minimizadas.<sup>41,43</sup>

O primeiro método proposto neste trabalho consiste na oxidação de suspensões aquosas de materiais certificados de referência (CRM) biológicos com  $\text{KMnO}_4$ , permitindo a determinação da concentração de mercúrio total, usando o mesmo sistema redutor empregado para determinação de  $\text{Hg}^{2+}$ . Na segunda parte deste trabalho, mercúrio inorgânico será determinado depois do tratamento dos CRM com TMAH e mercúrio total será determinado nas mesmas amostras pelo aquecimento do tubo de quartzo em uma chama de ar/acetileno. Alternativamente mercúrio total será determinado depois da digestão ácida das amostras em forno de microondas, por CV AAS, mantendo-se o tubo de quartzo na temperatura ambiente.

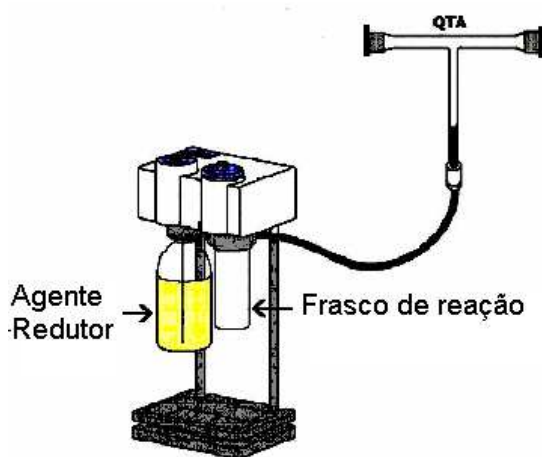
## 2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de procedimentos simples, rápidos e confiáveis para a especiação de mercúrio em amostras biológicas certificadas de referência por espectrometria de absorção atômica com vapor frio (CV AAS) e empregando  $\text{KMnO}_4$  como agente oxidante, tratamento da amostra com TMAH ou digestão ácida assistida por microondas.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Instrumentação

Para a determinação de mercúrio por CV AAS se empregou um sistema de geração química de vapor (MHS-15 da Perkin Elmer, CT, EUA) operado em modo batelada acoplado ao espectrômetro de absorção atômica (AAnalyst 100, Perkin Elmer) equipado com uma lâmpada de cátodo oco de mercúrio (Perkin Elmer) e um corretor de fundo de deutério. As seguintes condições de operação foram adotadas: comprimento de onda, 253,7 nm; fenda espectral, 0,7 nm; corrente, 6,0 mA. Para todas as medidas um tubo de quartzo com comprimento de 165 mm e um diâmetro de 12 mm posicionado no caminho óptico foi usado, mantido a temperatura ambiente ou, ocasionalmente, aquecido a aproximadamente 700 °C em uma chama de ar/acetileno, com vazões de 7,0 L min<sup>-1</sup> (ar) e 1,5 L min<sup>-1</sup> (acetileno). Argônio com uma pureza de 99,996% (White Martins, São Paulo, Brasil) foi usado como gás carreador para o vapor de mercúrio, a uma pressão de 250 kPa. Neste caso, área de pico foi usada para avaliação do sinal. As amostras foram pesadas usando uma microbalança AG204 (Mettler Toledo, Greifensee, Suíça). A digestão ácida das amostras assistida por microondas foi realizada em um forno de microondas MLS-1200 MEGA (Milestone, Sorisole, Itália). A Figura 1 mostra o sistema MHS-15 com o atomizador de quartzo (QTA).



**Figura 1** – Sistema MHS-15 de geração química de vapor com atomizador de quartzo.

Para a determinação de Hg total por CV-GF AAS foi empregado um espectrômetro de absorção atômica AAS 5 EA (Analytik Jena, Jena, Alemanha) equipado com um sistema de correção de fundo com fonte contínua (lâmpada de arco de deutério) e um atomizador eletrotérmico com tubo de grafite aquecido transversalmente. Um sistema de geração química de vapor HS 5 (Analytik Jena) operado em modo de batelada, foi acoplado ao atomizador eletrotérmico via um amostrador automático para forno MPE 5 (Analytik Jena) usado na introdução do vapor de mercúrio no forno de grafite. O vapor de mercúrio gerado no reator foi transportado ao tubo de grafite através de uma linha de transferência de politetrafluoretileno (PTFE) de 2,0 mm de diâmetro e 0,5 m de comprimento, conectada ao amostrador automático e a um capilar de titânio de 1,0 mm de diâmetro na outra extremidade. O capilar de titânio foi introduzido no orifício do tubo de grafite via amostrador automático. Argônio foi usado como gás carreador para o vapor de mercúrio, e como gás de purga e de proteção para o atomizador de grafite. Tubos de grafite sem plataforma recobertos piroliticamente (Analytik Jena) foram usados. Altura de pico, que neste caso é mais sensível do que a área, foi usada exclusivamente para a avaliação do sinal neste sistema, já que os efeitos cinéticos na geração do vapor frio são compensados pela retenção do vapor no tubo de grafite tratado. A lâmpada de cátodo oco de mercúrio (IST-Horseheads, NY) foi operada a 6,0 mA (comprimento de onda 253,7 nm; fenda espectral 0,5 nm). O sistema de geração de vapor foi operado usando-se as seguintes condições otimizadas:<sup>2</sup> volume de amostra: 3,0 mL; tempo de bombeamento, 20 s; tempo de reação, 20 s; tempo de limpeza, 10 s. A vazão de gás para as etapas de bombeamento, reação e limpeza foi 300 mL min<sup>-1</sup>. Uma solução 3,0% m/v de tetrahidroborato de sódio estabilizada em hidróxido de sódio 1,0% m/v foi usada como agente redutor.

O programa de temperatura do forno de grafite usado para retenção e atomização do mercúrio é mostrado na Tabela 1. O tubo de grafite foi previamente tratado com ouro, como descrito no item a seguir.

**Tabela 1** – Programa de temperatura do forno de grafite para determinação de mercúrio total por CV-GF AAS.

Etapa	Parâmetros			
	Temperatura/ °C	Rampa/ °C s <sup>-1</sup>	Permanência/ s	Vazão de gás/ mL min <sup>-1</sup>
Pré-aquecimento <sup>a</sup>	100	25	10	100
Auto Zero	100	0	6	100
Atomização <sup>b</sup>	700	250	5	0
Limpeza	1000	250	5	250

<sup>a</sup> Coleta do vapor de mercúrio neste estágio. <sup>b</sup> Registro da absorvância em altura de pico.

### 3.2. Tratamento do tubo de grafite com um modificador permanente

Tubos de grafite piroliticamente recobertos foram pré-tratados pela pipetagem de 40 µL de uma solução padrão de ouro 500 mg L<sup>-1</sup> no tubo e submetendo-o a um programa de temperatura já usado em um trabalho prévio,<sup>2</sup> usando-se temperatura de pirólise de 160 °C, atomização de 900 °C e limpeza de 1000 °C. Esse procedimento foi repetido 25 vezes, resultando em uma massa total de 500 µg do modificador depositado na parede do tubo de grafite. Ouro foi escolhido como modificador permanente devido à alta afinidade que apresenta por mercúrio, proporcionando assim uma etapa de retenção muito efetiva.

### 3.3. Reagentes e materiais de referência

Todos os reagentes usados foram, no mínimo, de grau analítico e as soluções foram preparadas usando água de alta pureza com uma resistividade de 18,2 MΩ cm, obtida a partir de um sistema de purificação de água (Milli-Q Plus, Millipore, Bedford, MA, EUA). Ácido clorídrico 37% (Merck, Darmstadt, Alemanha, 1003171000), ácido nítrico 65% (Merck, 1004561000) e n-propanol (Nuclear, São Paulo, Brasil, 311629) foram bi-destillados em um sistema de destilação abaixo do ponto de ebulição (Kürner

Analysentechnik, Rosenheim, Alemanha). Uma solução de TMAH 25% m/v em meio de metanol (Fluka, Buchs, Suíça, 87732) foi usada para tratar as amostras antes da determinação de mercúrio. Ácido nítrico e peróxido de hidrogênio 30% v/v (Merck, K27281110) foram empregados para a digestão da amostra assistida por microondas. O pH das amostras digeridas foi medido com um papel indicador universal em listras plásticas (Carlo Erba, 435121). A solução do agente redutor foi preparada pela dissolução de  $\text{NaBH}_4$  sólido (Nuclear, 311898) e NaOH em peletes (Carlo Erba, Milão, Itália, 480498), e estocados em frasco de polipropileno (PP) sob refrigeração. A solução do agente oxidante foi preparada pela dissolução de  $\text{KMnO}_4$  sólido (Merck, 5082) em frasco de PP idêntico ao usado para o preparo das amostras. Soluções de referência de mercúrio inorgânico na faixa entre 1,0 e 50,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  foram preparadas diariamente pela diluição seqüencial apropriada da solução estoque de mercúrio inorgânico 1000  $\text{mg L}^{-1}$  (Merck, 1702260500). Cloreto de metilmercúrio 95% (Alfa Aesar, Ward Hill, MA, EUA) foi empregado para preparar soluções por diluição seqüencial. Agente anti-espumante Antifoam A (Fluka, 10794) foi usado para a análise das amostras.

Frascos de PP foram usados para o preparo e preservação das amostras (Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça, 91015). Frascos de plástico e vidro foram lavados com água da torneira e uma solução de Extran diluída (Merck). Posteriormente, foram imersos em uma solução de  $\text{HNO}_3$  10% v/v por no mínimo 48 h, e rinsados exaustivamente com água desionizada antes do seu uso.

Os seguintes materiais certificados de referência foram analisados: BCR 186 (rim de porco liofilizado), BCR 278R (tecido de mexilhão), BCR 397 (cabelo humano) e ERM-CE 278 (tecido de mexilhão) do Institute for Reference Materials and Measurements (Geel, Bélgica), GBW 9101 (cabelo humano) do Shanghai Institute of Nuclear Research of China (Shanghai, China), TORT-2 (hepatopâncreas de lagosta), DORM-1 (músculo de peixe), e DOLT-2 e DOLT-3 (fígado de peixe) do National Research Council Canada (Ottawa, Ontário, Canadá).

### 3.4. Preparo da amostra

Para o tratamento alcalino, os materiais certificados de referência (CRM) foram preparados misturando-se 100,0 – 500,0 mg da amostra biológica com a solução de TMAH 25% m/v. Um volume de 5,0  $\mu$ L de TMAH foi adicionado para cada mg de amostra, usando-se no mínimo 1,0 mL quando a massa da amostra foi menor do que 200,0 mg. A suspensão do CRM foi deixada em repouso por, no mínimo, 3 h à temperatura ambiente e então o volume foi completado até 25,0 mL com água desionizada. A concentração final de TMAH na suspensão foi 1,0 – 2,5% m/v.

Para a digestão dos CRM em forno de microondas, uma massa de 100,0 – 250,0 mg foi misturada com 3,0 mL de  $\text{HNO}_3$  concentrado e 0,5 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% v/v. A digestão ácida assistida por microondas foi realizada em um forno de microondas empregando um programa de cinco etapas recomendado pelo fabricante na seguinte ordem: um minuto em 250 W, um minuto em 0 W, cinco minutos em 400 W e cinco minutos em 650 W, seguido por cinco minutos de ventilação, sendo que a solução resultante da digestão em microondas teve o volume completado para 25,0 mL com água desionizada.

Para o procedimento com oxidação *in situ* da amostra com permanganato de potássio, os CRM foram preparados simplesmente pela mistura de 100,0 – 500,0 mg da amostra biológica pó com água desionizada para um volume final de 25,0 mL. Sob essas condições, mercúrio foi encontrado ser estável na suspensão da amostra. A suspensão final foi opaca, lembrando a cor original da amostra em pó. As suspensões foram preparadas e estocadas no mesmo frasco, simplificando o procedimento.

### 3.5. Procedimento analítico

Para as amostras tratadas com TMAH ou digeridas em microondas, uma alíquota de 3,0 mL da amostra ou solução padrão foi transferida ao frasco de reação. O agente redutor foi adicionado continuamente a esse frasco por 5 s e o vapor gerado foi transportado para o tubo de quartzo. Para o procedimento com tratamento alcalino, junto com a amostra, foi necessário adicionar 2,0 mL de  $\text{HCl}$  2,5 mol  $\text{L}^{-1}$  e 100  $\mu$ L de agente anti-espumante. Estas mesmas condições foram empregadas para a determinação de mercúrio total a partir das

amostras tratadas com TMAH com aquecimento do tudo de quartzo na chama de ar/acetileno. As soluções padrão foram preparadas em TMAH 1,0% v/v na faixa de concentração de 1,0 a 50,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Uma solução de  $\text{NaBH}_4$  1,0% m/v estabilizada com NaOH 0,5% m/v foi usada como agente redutor para determinar mercúrio total nos CRM digeridos em microondas, enquanto a concentração para determinar mercúrio inorgânico, a partir dos CRM em meio de TMAH, foi de 3,0% m/v de  $\text{NaBH}_4$  estabilizada com NaOH 1,0% m/v. As soluções de agente redutor foram injetadas por 5 s ao frasco de reação, resultando em um volume aproximado de 1,5 mL. Somente uma curva de calibração contra padrões aquosos em meio ácido foi realizada para os dois procedimentos (tratamento com TMAH e digestão ácida). As soluções padrão foram preparadas em ácido nítrico 5,0% v/v na faixa de concentração de 3,0 a 15,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Essas soluções foram preparadas imediatamente antes das determinações.

Para o procedimento analítico com oxidação *in situ* da amostra, uma alíquota de 3,0 mL da suspensão da amostra agitada foi transferida ao frasco de reação juntamente com 2,0 mL de HCl 1,0 mol  $\text{L}^{-1}$ , com a adição de 100  $\mu\text{L}$  de Antifoam A. Uma solução de  $\text{NaBH}_4$  1,5% m/v estabilizada com NaOH 0,5% m/v foi adicionada ao frasco de reação por 5 s para a determinação de mercúrio inorgânico. Para se determinar mercúrio total, foi necessário a adição de 0,5 mL ou 1,0 mL de uma solução de  $\text{KMnO}_4$  2,0% m/v à mistura e esperar 2 minutos antes da medida, exceto para as soluções de calibração, as quais puderam ser medidas imediatamente. Maior volume da solução de  $\text{KMnO}_4$  2,0% m/v foi necessário para os CRM TORT-2 e ERM-CE 278, devido às massas maiores, de cerca de 500,0 mg que foram requeridas para essas duas amostras. Neste caso, uma solução de  $\text{NaBH}_4$  3,0% m/v estabilizada com NaOH 1,0% m/v foi usada como agente redutor. A calibração foi realizada contra padrões aquosos na faixa de concentração de 3,0 a 15,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Essas soluções foram preparadas imediatamente antes das determinações. Por outro lado, para a determinação de mercúrio total, 3,0 mL da solução padrão em  $\text{HNO}_3$  5,0% v/v foi misturado com 200  $\mu\text{L}$  da solução de  $\text{KMnO}_4$  2,0% m/v.

A concentração da fração orgânica foi calculada, em todos os procedimentos, como a diferença entre o mercúrio total e o inorgânico determinados.

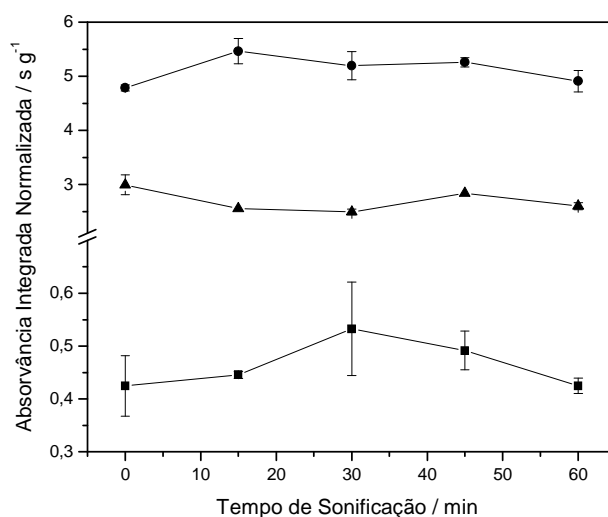


## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Determinação de mercúrio total e inorgânico em suspensões aquosas de amostras biológicas usando CV AAS e oxidação *in situ* com $\text{KMnO}_4$

#### 4.1.1. Avaliação do tempo de sonificação sobre o sinal de mercúrio

O efeito da cavitação ultra-sônica sobre o sinal obtido para mercúrio inorgânico a partir das suspensões aquosas dos CRM é mostrado na Figura 2.



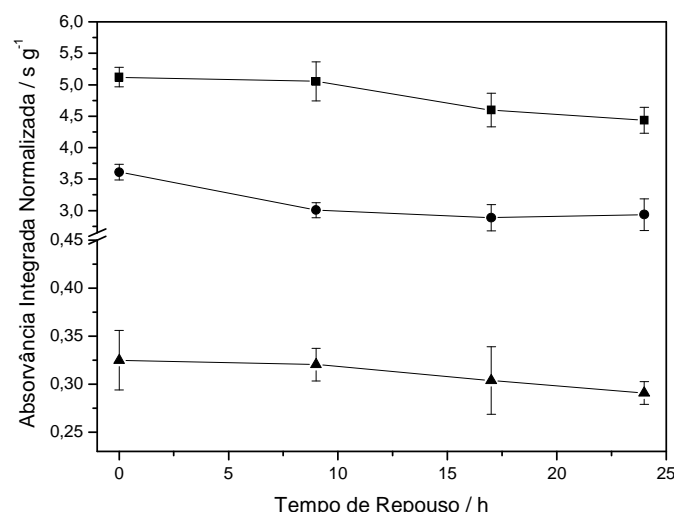
**Figura 2** – Efeito do tempo de sonificação sobre o sinal de absorvância normalizado para mercúrio a partir das suspensões das amostras preparadas em água. (—●—) DOLT-3 3,6  $\mu\text{g L}^{-1}$ , (—▲—) BCR 186 3,2  $\mu\text{g L}^{-1}$  e (—■—) TORT-2 0,5  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Os sinais de absorvância integrada foram normalizados para a massa de amostra na suspensão. Como pode ser visto, não há efeito significativo do tempo de sonificação sobre as intensidades do sinal para mercúrio na faixa de tempo estudada para qualquer das três amostras, como poderia ser esperado, já que as amostras não foram acidificadas. Visto que a sonificação das amostras não promoveu nenhuma vantagem adicional para a extração do mercúrio, esta etapa não foi adotada nos experimentos adicionais. O tempo e a amplitude de sonificação têm sido mais importantes para amostras ambientais, tal como investigado por

Krishna *et al.*<sup>1</sup> para cinza de carvão, líquen e musgo enriquecido com metilmercúrio e mercúrio inorgânico. Entretanto, o tempo de sonificação estudado neste trabalho, foi significativamente mais curto que aquele empregado por Krishna *et al.*

#### 4.1.2. Efeito do tempo de repouso sobre o sinal de mercúrio

O efeito do tempo de repouso da suspensão preparada em água sobre a intensidade do sinal de mercúrio inorgânico pode ser visto na Figura 3. Os sinais de absorvância integrada foram normalizados para a massa da suspensão.



**Figura 3** – Efeito do tempo de repouso sobre o sinal de absorvância normalizado para mercúrio a partir das suspensões das amostras preparadas em água. (—■—) DOLT-3 3,6  $\mu\text{g L}^{-1}$ , (—●—) BCR 186 3,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  e (—▲—) TORT-2 1,2  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

O sinal para mercúrio diminuiu, embora em uma extensão relativamente pequena, com o aumento do tempo de repouso de 0 para 24 horas. Isso pode ser atribuído a perdas da fração de Hg solubilizado por adsorção nas paredes do frasco de PP e/ou volatilização de  $\text{Hg}^0$ , já que  $\text{Hg}^{2+}$  pode ser espontaneamente convertido a Hg elementar na solução e ser perdido por volatilização.<sup>47,48</sup> Essa perda parcial, entretanto, pode ser facilmente evitada pela análise da amostra logo após o preparo da suspensão, obtendo-se máxima sensibilidade

sem qualquer tempo de repouso, ao contrário de outros procedimentos de amostragem em suspensão.<sup>9,49</sup> Apesar disso, mesmo depois de 10 horas de repouso, as perdas podem ser consideradas insignificantes. De fato, esse comportamento foi primeiramente observado em nosso estudo prévio para avaliar a concentração necessária de TMAH para tratar amostras biológicas e determinar as espécies de mercúrio.<sup>4</sup> Esse estudo mostrou que mesmo em baixas concentrações de TMAH o sinal para mercúrio ficou próximo daquele obtido com concentrações mais altas. Naturalmente, a próxima etapa foi eliminar o TMAH e investigar uma suspensão com apenas água e a amostra. Neste contexto, o uso de tratamento com água pode ser uma boa alternativa para minimizar as desvantagens de procedimentos convencionais em termos de número de etapas analíticas, tempo, eficiência de extração e baixo consumo de reagentes.

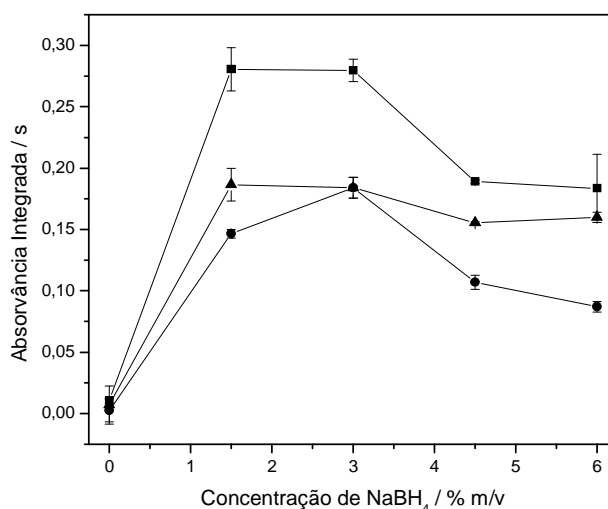
Uma possível explicação para esse comportamento é que existe uma reação muito rápida envolvida no processo de geração química de vapor de mercúrio a partir de partículas sólidas.<sup>40</sup> Pode-se assumir que a maioria do mercúrio permanece ocluído nas partículas sólidas até a adição do agente redutor, o qual é capaz de liberar o mercúrio para a fase vapor devido a um aumento na entropia do sistema. O mercúrio liberado a partir das partículas sólidas para a solução é rapidamente transformado em vapor de mercúrio atômico, o qual é então carregado pelo fluxo de argônio para o tubo de quartzo.

Preparar uma suspensão aquosa de amostras biológicas pode ser uma alternativa para a digestão ácida convencional a fim de se determinar mercúrio e suas espécies nessas amostras, evitando-se a interconversão das espécies. Já que nenhum aquecimento é necessário, perda do analito devido à volatilização é evitada, e o procedimento é também muito menos propenso a contaminação. Uma vantagem adicional é a não utilização de quantidades grandes de ácidos minerais concentrados, os quais sempre representam um risco para a saúde do operador, para o meio ambiente e para a manutenção dos equipamentos.<sup>8</sup>

#### **4.1.3. Efeito da concentração de NaBH<sub>4</sub>**

Como mostrado na Figura 4, a absorvância integrada aumenta com o aumento da concentração de NaBH<sub>4</sub> para a suspensão da DOLT-3 e solução padrão de mercúrio até

1,5% m/v, alcançando um platô para concentrações de  $\text{NaBH}_4$  de 1,5 a 3,0% m/v, diminuindo rapidamente para concentrações mais altas. Uma ligeira diferença pode ser notada para a suspensão da BCR 186, para a qual o sinal aumentou até uma concentração de  $\text{NaBH}_4$  de 3,0% m/v, diminuindo rapidamente para concentrações mais altas.

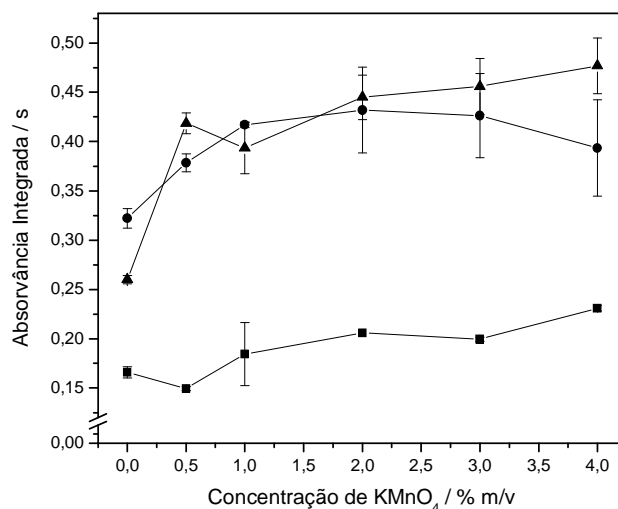


**Figura 4** – Efeito da concentração de  $\text{NaBH}_4$  sobre o sinal de absorvância para suspensões de amostra e uma solução padrão preparadas em água. (—■—) DOLT-3  $8,2 \mu\text{g L}^{-1}$ , (—●—) BCR 186  $6,8 \mu\text{g L}^{-1}$  e (—▲—)  $\text{Hg}^{2+}$   $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ .

A diminuição do sinal para concentrações mais altas de agente redutor pode estar relacionada ao excesso de vapor formado, além do vapor de mercúrio, durante a reação de geração química de vapor devido à alta concentração de  $\text{NaBH}_4$ , incluindo vapor de água, que em ocasiões pode condensar na linha de transferência, impedindo a passagem do vapor do analito. Consequentemente, a concentração de  $\text{NaBH}_4$  foi selecionada como 1,5% m/v estabilizada com 0,5% m/v de NaOH para determinação de Hg inorgânico e 3,0% m/v em NaOH 1,0% m/v para determinação de Hg total, a fim de compensar a presença de  $\text{KMnO}_4$ .

#### 4.1.4. Avaliação da concentração de $\text{KMnO}_4$

Mercúrio inorgânico foi determinado usando a redução com  $\text{NaBH}_4$  a partir da suspensão, ao passo que mercúrio total foi determinado depois da oxidação do mercúrio orgânico para mercúrio inorgânico na suspensão através da reação com  $\text{KMnO}_4$ . O efeito da concentração de  $\text{KMnO}_4$  no sinal analítico foi avaliado pelo uso de dois CRM e uma solução padrão de mercúrio inorgânico. Pela Figura 5 pode ser visto que, sem a adição de  $\text{KMnO}_4$ , o sinal é relativamente baixo para ambas as amostras e para a solução padrão, porque sob essas condições somente mercúrio inorgânico reage efetivamente com  $\text{NaBH}_4$  para formar vapor de mercúrio elementar. Com o aumento da concentração de  $\text{KMnO}_4$  o sinal para mercúrio nas amostras e solução padrão aumenta significativamente, como resultado da conversão de mercúrio orgânico a  $\text{Hg}^{2+}$  nas amostras e devido a uma possível ação catalítica do manganês para a reação de geração de vapor de mercúrio a partir da solução padrão, o que a princípio parece ser contraditório, já que se trata de um oxidante. A adição de uma solução de  $\text{KMnO}_4$  2,0% m/v permitiu obtenção de intensidades de sinal adequadas, com um comportamento similar para todas as amostras analisadas e para a solução padrão. Portanto, essa concentração de  $\text{KMnO}_4$  foi escolhida como ótima e usada nos experimentos posteriores. A adição de  $\text{KMnO}_4$  em altas concentrações resultou na formação de um precipitado marrom para algumas amostras, muito provavelmente devido à formação de  $\text{MnO}_2$ . Por outro lado, a cor roxa característica do  $\text{KMnO}_4$  desaparecia em menos de um minuto para as suspensões preparadas com aproximadamente 500 mg de amostra, quando concentrações mais baixas de  $\text{KMnO}_4$  foram adicionadas. Neste caso, concentrações mais altas foram necessárias para atingir completa oxidação do analito, já que os componentes da amostra estavam consumindo a maioria do  $\text{KMnO}_4$ .



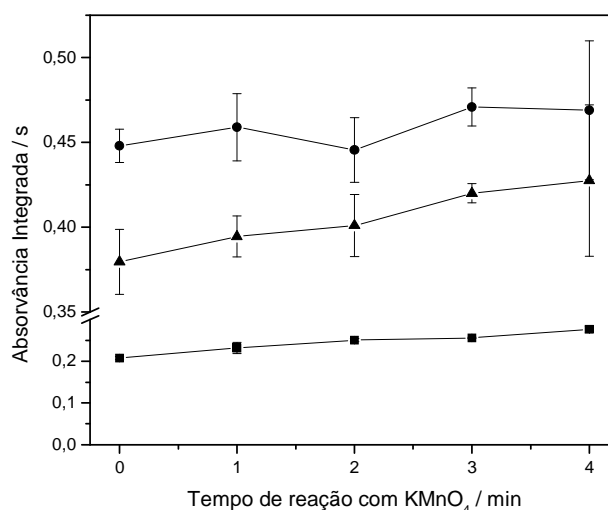
**Figura 5** – Efeito da concentração de  $\text{KMnO}_4$  sobre o sinal de absorvância para mercúrio nas suspensões de amostra e solução padrão preparadas em água. (—●—) DOLT-3  $13,5 \mu\text{g L}^{-1}$ , (—■—) BCR 186  $7,9 \mu\text{g L}^{-1}$  e (—▲—)  $\text{Hg}^{2+}$   $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$ .

#### 4.1.5. Avaliação do tempo de reação com a solução de $\text{KMnO}_4$

Um ponto muito importante para mencionar é a formação do hidreto volátil  $\text{CH}_3\text{HgH}$  a partir da redução do metilmercúrio, por  $\text{NaBH}_4$  em meio ácido, ao invés do vapor de mercúrio atômico, o qual é produzido a partir da redução de  $\text{Hg}^{2+}$  por  $\text{NaBH}_4$  ou  $\text{SnCl}_2$ .<sup>5</sup> Para que se possa medir o mercúrio total, uma decomposição prévia do metilmercúrio e de outras espécies orgânicas é necessária,<sup>6</sup> o que nesta parte do trabalho foi atingido pelo emprego da oxidação com  $\text{KMnO}_4$ , como já mencionado.

Depois da concentração de  $\text{KMnO}_4$ , otimizou-se o tempo requerido para oxidação total de mercúrio orgânico a  $\text{Hg}^{2+}$  nas amostras biológicas com uma solução de  $\text{KMnO}_4$  2,0% m/v, como visto na Figura 6. Um tempo de reação de dois minutos foi selecionado como ótimo para as amostras, já que para BCR 186 o sinal de mercúrio é repetível depois desse tempo, e nenhuma melhoria significativa foi obtida para períodos de reação mais longos para as outras amostras. Um outro detalhe importante reside no fato que a sedimentação de partículas sólidas após a formação da suspensão é mais rápida que aquela observada com o tratamento com TMAH. Este fato torna a agitação mecânica

imediatamente antes da pipetagem da amostra uma etapa muito importante, a fim de assegurar a homogeneidade da suspensão.



**Figura 6** – Efeito do tempo de reação com a solução de KMnO<sub>4</sub> 2,0% m/v sobre o sinal de absorvância para mercúrio nas suspensões de amostra e solução padrão preparadas em água.

(—●—) DOLT-3 14,4 µg L<sup>-1</sup>, (—■—) BCR 186 6,0 µg L<sup>-1</sup> e (—▲—) Hg<sup>2+</sup> 10,0 µg L<sup>-1</sup>.

#### 4.1.6. Parâmetros de mérito

Os parâmetros de mérito para ambos os procedimentos foram obtidos usando soluções aquosas de Hg<sup>2+</sup> com e sem a adição de KMnO<sub>4</sub>. Como é mostrado na Tabela 2, um limite de detecção (LD) mais baixo foi obtido para a determinação de mercúrio total usando KMnO<sub>4</sub>, visto que a sensibilidade, medida pela inclinação da curva de calibração, foi mais alta para este procedimento. O LD foi definido como três vezes o desvio padrão de dez leituras do branco, dividido pela inclinação da curva de calibração. O limite de quantificação (LQ) é definido como três vezes o LD. Os valores de limite de detecção mostrados na Tabela 2 foram calculados para as amostras baseados em uma massa de 500 mg. Um ponto para mencionar é que as sensibilidades para a determinação de mercúrio total e inorgânico estão muito próximas, como originalmente proposto, sendo ainda maior para mercúrio total, diferentemente do procedimento com o tubo de quartzo aquecido, a ser discutido. Em geral, os LD obtidos foram perfeitamente adequados para as amostras

biológicas analisadas não se necessitando de procedimentos de pré-concentração, exceto para a amostra ERM-CE 278, que tem uma concentração muito baixa de mercúrio inorgânico.

**Tabela 2** – Figuras de mérito para a determinação de Hg total e inorgânico em solução padrão aquosa com e sem  $\text{KMnO}_4$  2,0% m/v, por CV AAS.

Solução padrão	$\text{KMnO}_4$	Inclinação / ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) <sup>-1</sup> s	R	LD / ng g <sup>-1</sup>	Faixa de Calibração / $\mu\text{g L}^{-1}$
$\text{Hg}^{2+}$	Não	0,037	0,9992	20	3,0 – 15,0
Hg total	Sim	0,048	0,9999	16	3,0 – 15,0

#### 4.1.7. Calibração com metilmercúrio

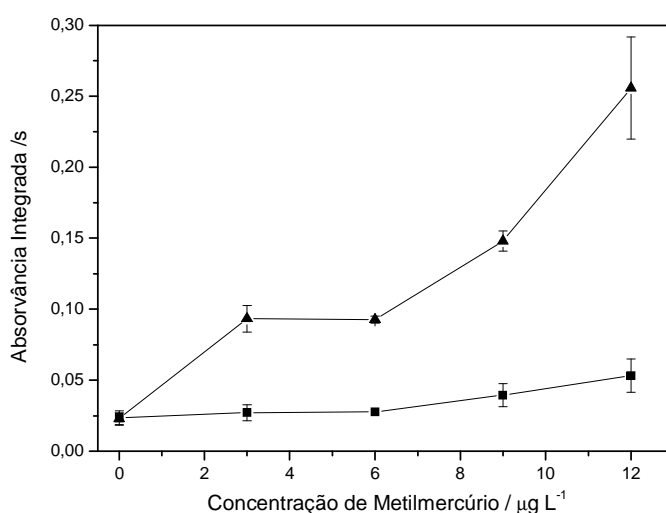
Um estudo com soluções de metilmercúrio foi realizado para avaliar seu comportamento em diferentes meios de preparo. Soluções padrão de metilmercúrio foram preparadas em ácido clorídrico 0,6 mol L<sup>-1</sup> ou em n-propanol. Imediatamente antes da medida, 1,0 mL de uma solução de HCl 1,0 mol L<sup>-1</sup> foi adicionado às soluções de metilmercúrio quando em meio de n-propanol. A calibração para cada meio das soluções padrão de metilmercúrio foi realizada com e sem a adição de 200  $\mu\text{L}$  de uma solução de  $\text{KMnO}_4$  2,0% m/v. A Tabela 3 apresenta os parâmetros de mérito para as curvas de calibração em ambos os meios com adição de  $\text{KMnO}_4$ . Esses resultados confirmam que metilmercúrio é eficientemente hidrolisado pela oxidação com  $\text{KMnO}_4$ , particularmente porque a sensibilidade da curva de calibração com  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  em HCl na presença de  $\text{KMnO}_4$  é muito similar àquela para a determinação de  $\text{Hg}^{2+}$ . Uma sensibilidade 10% menor foi obtida para a curva de calibração realizada com  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  em n-propanol, o que pode estar relacionado à maior viscosidade deste meio, o que dificulta a liberação do vapor de Hg.



**Tabela 3** – Figuras de mérito para a determinação de mercúrio a partir de soluções padrão de metilmercúrio em HCl e n-propanol com  $\text{KMnO}_4$  2,0% m/v, por CV AAS.

Solução padrão	$\text{KMnO}_4$	Inclinação / ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) <sup>-1</sup> s	R	LD / ng g <sup>-1</sup>	Faixa de Calibração / $\mu\text{g L}^{-1}$
$\text{CH}_3\text{Hg}^+/\text{HCl}$	Sim	0,036	0,9999	–	3,0 – 12,6
$\text{CH}_3\text{Hg}^+/\text{n-propanol}$	Sim	0,033	0,9998	–	3,0 – 12,0

Um comportamento um pouco diferente foi observado para as curvas de calibração sem a adição de  $\text{KMnO}_4$ . Esperava-se que nenhum sinal seria obtido sob essas condições, já que nenhuma etapa de oxidação foi empregada. A Figura 7 mostra as curvas em HCl 0,6 mol L<sup>-1</sup> e em n-propanol, sem a etapa de oxidação com  $\text{KMnO}_4$ . Pode ser observado que hidrólise parcial de metilmercúrio acontece e que este efeito é fortemente dependente da concentração de metilmercúrio. Uma reação rápida e possivelmente catalisada por ácido pode acontecer, sendo as soluções de calibração em meio ácido aquelas que sofrem a hidrólise mais acentuada. Apesar disso, o efeito tem influência negligenciável na análise das amostras biológicas, já que todas têm concentração de metilmercúrio em solução menor ou igual a 6,4  $\mu\text{g L}^{-1}$ , concentração na qual o efeito da hidrólise não é significativo.



**Figura 7** – Avaliação do meio de preparo da solução padrão de metilmercúrio.

(—■—) n-propanol e (—▲—) ácido clorídrico 0,6 mol L<sup>-1</sup>.

#### 4.1.8. Resultados analíticos

Na maioria dos CRM, metilmercúrio e mercúrio inorgânico são encontrados em concentrações muito mais altas em relação às outras espécies, dependendo da natureza do CRM. Em todos os casos, a diferença entre o mercúrio total e o inorgânico foi considerada como metilmercúrio, o que teve uma boa concordância com os valores certificados.

A exatidão do método foi avaliada pela análise de vários CRM. Os resultados obtidos para Hg total,  $\text{Hg}^{2+}$  e  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  estão apresentados na Tabela 4. Os valores determinados para mercúrio inorgânico concordam com a diferença entre as concentrações de metilmercúrio e mercúrio total certificadas ou com resultados publicados previamente [4], ficando dentro do limite de confiança de 95% do valor certificado ou próximo dos valores informados dos materiais de referência investigados. A concentração de metilmercúrio é reportada para duas amostras certificadas e os valores estão em boa concordância com os obtidos neste trabalho. Esta concordância é outra evidência para demonstrar que os valores obtidos por CV AAS sem a oxidação da amostra corresponde à concentração de  $\text{Hg}^{2+}$ . A concentração de mercúrio orgânico obtida, calculada como a diferença entre os valores obtidos com e sem oxidação usando  $\text{KMnO}_4$ , também concorda com a concentração de metilmercúrio certificada, de acordo com o teste  $t$  para um nível de confiança de 95%. Isso demonstra que a concentração de mercúrio orgânico obtida pela diferença é praticamente de metilmercúrio. O desvio padrão relativo foi menor que 7,0% para a maioria das amostras.

**Tabela 4** – Resultados analíticos para a determinação de Hg total (com adição de  $\text{KMnO}_4$ ), inorgânico (sem adição de  $\text{KMnO}_4$ ) e metilmercúrio (obtido pela diferença entre Hg total e  $\text{Hg}^{2+}$ ) em CRM preparados na forma de suspensão aquosa por CV AAS. Valores obtidos (média  $\pm$  limite de confiança) em  $\mu\text{g g}^{-1}$ ;  $n = 3$ .

	Mercúrio total		Metilmercúrio (como Hg)		Mercúrio inorgânico	
	<b>Certificado</b>	Encontrado	<b>Certificado</b>	Encontrado <sup>a</sup>	<b>Informado<sup>b</sup></b>	Encontrado
BCR 186	<b>1,97 <math>\pm</math> 0,04</b>	2,01 $\pm$ 0,22	<b>NI</b>	0,70 $\pm$ 0,08	<b>1,5 <math>\pm</math> 0,1<sup>c</sup></b>	1,30 $\pm$ 0,14
DOLT-3	<b>3,37 <math>\pm</math> 0,14</b>	3,51 $\pm$ 0,19	<b>1,59 <math>\pm</math> 0,12</b>	1,65 $\pm$ 0,04	<b>1,78</b>	1,86 $\pm$ 0,19
TORT-2	<b>0,27 <math>\pm</math> 0,06</b>	0,28 $\pm$ 0,03	<b>0,152 <math>\pm</math> 0,013</b>	0,148 $\pm$ 0,009	<b>0,118</b>	0,135 $\pm$ 0,021
ERM-CE 278	<b>0,196 <math>\pm</math> 0,009</b>	0,193 $\pm$ 0,031	<b>NI</b>	ND	<b>NI</b>	< LQ

<sup>a</sup> Calculado como a diferença entre Hg total e Hg inorgânico. <sup>b</sup> Calculado como a diferença entre Hg total e  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  como Hg.

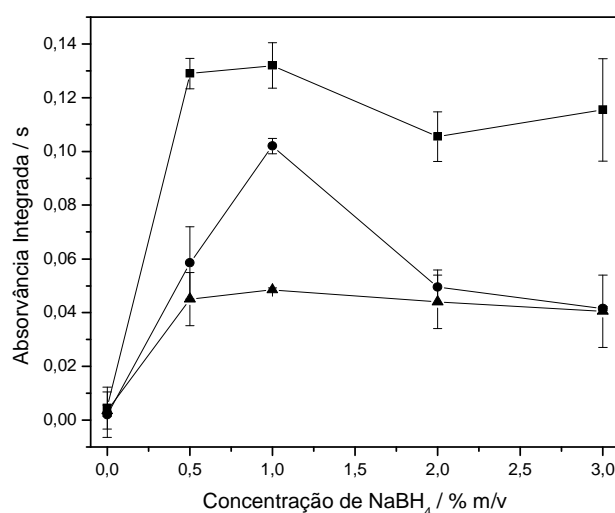
<sup>c</sup> Determinado por Torres *et al.* <sup>4</sup>. NI: não informado. ND: não determinado.

#### **4.2. Determinação de mercúrio total e inorgânico em amostras biológicas usando CV AAS após o pré-tratamento com TMAH ou microondas**

Em um trabalho prévio, Torres *et al.*<sup>4</sup> desenvolveram uma técnica usando CV AAS para especiação de mercúrio através da solubilização com TMAH em amostras biológicas. A geração química de vapor, obtida pelo uso de  $\text{NaBH}_4$ , permitiu a determinação de mercúrio total com o tubo de quartzo aquecido em uma chama de ar-acetileno, e de mercúrio inorgânico com o mesmo atomizador a temperatura ambiente. A partir daí, ficou claro que o tratamento das amostras com TMAH é suave e incapaz de quebrar a ligação entre mercúrio e o radical metil sob as condições empregadas. Entretanto, o aquecimento do tubo de quartzo diminui consideravelmente a sensibilidade para a determinação de mercúrio total, tendo em vista a redução do tempo de residência dos átomos na célula de absorção. Para contornar esta limitação, uma alternativa muito simples é a determinação de mercúrio total a temperatura ambiente depois de um pré-tratamento da amostra que assegure que todas as espécies de mercúrio tenham sido oxidadas a  $\text{Hg}^{2+}$ . Deste modo, é possível determinar seletivamente as espécies de mercúrio presentes nas amostras biológicas, sendo o mercúrio inorgânico determinado nas amostras tratadas com TMAH e o mercúrio total ( $\text{Hg}^{2+}$  e mercúrio na forma orgânica) determinado nas amostras após digestão ácida em forno de microondas pela técnica de CV AAS com o tubo de quartzo mantido à temperatura ambiente. Nesta parte do trabalho serão apresentados os resultados da determinação de mercúrio inorgânico nos CRM tratados com TMAH, sendo a concentração de mercúrio total medida pela mesma técnica, mas com o aquecimento do tubo de quartzo em uma chama de ar/acetileno, ou depois da digestão ácida dos CRM em forno de microondas. CV-GF AAS com retenção do vapor em um tubo de grafite aquecido tratado com Au foi usada para otimizar algumas condições de geração de vapor nas amostras tratadas com TMAH. Como no método anterior, a concentração de mercúrio orgânico é obtido pela diferença.

#### 4.2.1. Efeito da concentração de $\text{NaBH}_4$

O efeito da concentração de  $\text{NaBH}_4$  sobre a geração de vapor frio a partir das amostras digeridas com ácido em forno de microondas ou tratadas com TMAH pode ser visto nas Figura 8 e 9, respectivamente. Para as amostras digeridas em microondas, a absorvância integrada aumenta com um aumento na concentração de  $\text{NaBH}_4$  para mercúrio total nas soluções de DOLT-3 e BCR 186 até 1,0% m/v, diminuindo para concentrações mais altas do agente redutor. Para a solução padrão de  $\text{Hg}^{2+}$ , a absorvância integrada aumenta com a concentração de  $\text{NaBH}_4$  até 1,0% m/v, mantendo-se em um platô para concentrações de  $\text{NaBH}_4$  de 1,0 a 3,0% m/v.



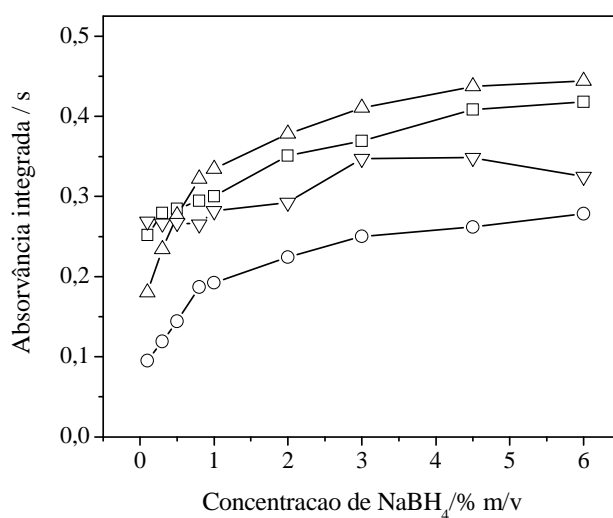
**Figura 8** – Efeito da concentração de  $\text{NaBH}_4$  sobre o sinal de absorvância para as soluções de amostra digeridas com ácido em forno de microondas e uma solução padrão em meio ácido.

(—■—) DOLT-3 13,3  $\mu\text{g L}^{-1}$ , (—●—) BCR 186 7,9  $\mu\text{g L}^{-1}$  e (—▲—)  $\text{Hg}^{2+}$  5,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

A diminuição do sinal de mercúrio nos CRM digeridos para concentrações mais altas de  $\text{NaBH}_4$  pode estar relacionada a alta produção de vapores durante a reação de geração química de vapor, o que pode diluir o vapor de mercúrio e diminuir o tempo de residência dos átomos de mercúrio na cela de absorção, e, portanto, o sinal de absorvância.

Desta forma, a concentração de  $\text{NaBH}_4$  foi selecionada como 1,0% m/v em NaOH 0,5% m/v para determinação de mercúrio total.

O perfil do gráfico para o estudo da concentração de  $\text{NaBH}_4$  por CV-GF AAS, obtido previamente<sup>4</sup>, com as suspensões de CRM tratados com TMAH difere do obtido para os CRM digeridos, como mostra a Figura 9. Para o meio alcalino, a absorvância aumenta com a concentração de  $\text{NaBH}_4$  para os três CRM até a maior concentração estudada, 6,0% m/v, enquanto que para a solução padrão em meio de TMAH o sinal é praticamente estável a partir de 3,0% m/v do redutor, similarmente ao caso anterior. O mais provável é que mais redutor é requerido neste meio em comparação às amostras digeridas devido à presença da matriz das amostras, visto que os CRM ficam na forma de suspensão no meio de TMAH. Entretanto, a concentração de  $\text{NaBH}_4$  selecionada foi de 3,0% m/v em NaOH 1,0% m/v a fim de reduzir a quantidade de água condensada na linha de transferência, a qual piora a precisão.

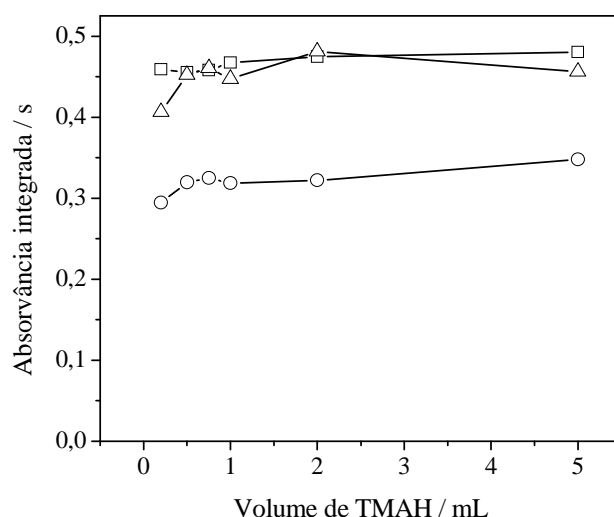


**Figura 9** – Efeito da concentração de  $\text{NaBH}_4$  sobre o sinal de absorvância para as suspensões de CRM tratados com TMAH e uma solução padrão em TMAH obtido por CV-GF AAS.

(—△—) DOLT-2  $10,8 \mu\text{g L}^{-1}$ , (—□—) BCR 186  $9,9 \mu\text{g L}^{-1}$ , (—○—) GBW 9101  $10,8 \mu\text{g L}^{-1}$   
e (—▽—)  $\text{Hg}^{2+}$   $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$ .

#### 4.2.2. Tratamento da amostra com TMAH

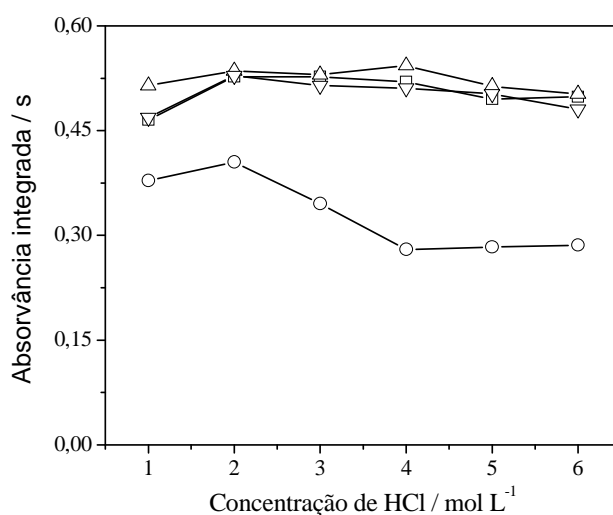
O efeito do volume da solução de TMAH sobre o sinal de absorvância do mercúrio previamente avaliado<sup>4</sup> para suspensões de três das amostras biológicas certificadas por CV-GF AAS é apresentado na Figura 10. As intensidades do sinal de mercúrio, normalizadas para a massa de amostra, foi quase constante para 1,0 a 3,0 mL de TMAH. Um detalhe importante para ser mencionado é a produção de espuma quando volumes relativamente grandes de TMAH foram empregados. Desta forma foi adotado o seguinte procedimento: 5  $\mu\text{L}$  de TMAH por mg de amostra, usando um mínimo de 1,0 mL do reagente para massas menores que 200 mg (para os CRM que apresentam concentrações mais altas de mercúrio).



**Figura 10** – Efeito do volume de TMAH sobre o sinal de absorvância para as suspensões de CRM tratados com TMAH obtido por CV-GF AAS. (—△—) DOLT-2  $8,6 \mu\text{g L}^{-1}$ , (—□—) BCR 186  $7,9 \mu\text{g L}^{-1}$  e (—○—) GBW 9101  $8,6 \mu\text{g L}^{-1}$ .

A concentração mais alta de HCl de  $2,5 \text{ mol L}^{-1}$  foi selecionada a partir dos resultados obtidos por CV-GF AAS,<sup>4</sup> de acordo com o gráfico da Figura 11. Foram usadas as mesmas condições: uma alíquota de 3,0 mL da suspensão do CRM em meio de TMAH

foi transferida para o frasco de reação juntamente com 2,0 mL de HCl 2,5 mol L<sup>-1</sup> e 100 µL de agente antiespumante.



**Figura 11** – Efeito da concentração de HCl sobre o sinal de absorvância para as suspensões de CRM tratados com TMAH e uma solução padrão em TMAH obtido por CV-GF AAS.  
(—△—) DOLT-2 10,8 µg L<sup>-1</sup>, (—□—) BCR 186 9,9 µg L<sup>-1</sup>, (—○—) GBW 9101 10,8 µg L<sup>-1</sup>  
e (—▽—) Hg<sup>2+</sup> 10,0 µg L<sup>-1</sup>.

#### 4.2.3. Digestão ácida dos CRM assistida por microondas

Pré-tratamento da amostra com digestão ácida da matéria orgânica é tipicamente requerido antes da pré-concentração de elementos traço presentes em amostras biológicas e ambientais. Felizmente, a geração química de vapor geralmente não requer decomposição completa da matéria orgânica. Tudo que é requerido em HG AAS e CV AAS é que o elemento do analito seja liberado de sua ligação química com os componentes da matriz e transformados em um estado de oxidação bem definido, tal como Hg<sup>2+</sup>, que pode ser reduzido a mercúrio elementar pelo redutor NaBH<sub>4</sub>.<sup>41,42</sup>



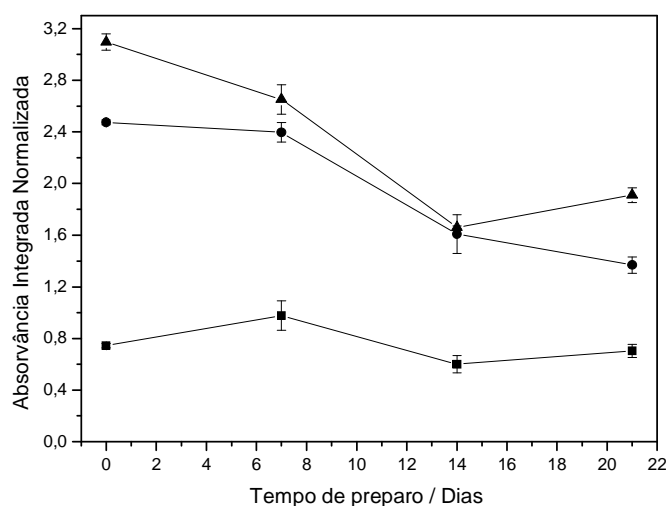
Visto que o meio da amostra neste procedimento de pré-tratamento é suficientemente ácido ( $\text{pH} < 0$ ) a etapa na qual o analito será determinado para as amostras digeridas é mais rápida que aquela para as amostras em TMAH. Isso acontece porque somente a solução da amostra é pipetada nesse procedimento, sem a necessidade de adição de ácido ou agente antiespumante. Além disso, o frasco de reação, depois de cada medida, permanecia muito limpo, em contraste com aquele usado para as suspensões em TMAH.

#### 4.2.4. Tempo de repouso para amostras em TMAH

As perdas durante a estocagem podem representar uma fração importante do mercúrio inicial presente na mesma solução e, conseqüentemente, podem causar sérios erros sistemáticos.<sup>47</sup> Dois grupos de pesquisa diferentes têm proposto explicação para esses eventos. De acordo com Bloom *et al.*,<sup>48</sup> mercúrio pode ser perdido para as paredes do frasco a partir de amostras não preservadas ou também preservadas em ácido. Garrafas de polietileno, por exemplo, permitiram a difusão de  $\text{Hg}^0$  através das paredes para e a partir das amostras, dependendo da concentração na amostra e na atmosfera de estocagem. Krivan *et al.*<sup>47</sup> propôs mecanismos para essas perdas, os quais também incluem adsorção de mercúrio nas paredes do vaso, volatilização de compostos de mercúrio e redução dos compostos de mercúrio a mercúrio elementar seguida por sua volatilização.

Tendo em vista esses pontos, um estudo para avaliar possíveis perdas de mercúrio durante a estocagem de amostras biológicas preparadas em TMAH foi realizado. Os frascos usados para este estudo foram de polipropileno cilíndrico fechados com um diâmetro de 2,7 cm e uma altura de 11,5 cm, a temperatura ambiente. O efeito do tempo de repouso sobre a intensidade do sinal de absorvância normalizado para três suspensões de CRM foi avaliado durante um período de vinte e um dias, como pode ser visto na Figura 12. O sinal de absorvância integrada para cada suspensão foi normalizado com relação ao de uma solução padrão de  $\text{Hg}^{2+}$   $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$  em  $\text{HNO}_3$  5,0% v/v preparada diariamente. As intensidades do sinal de absorvância para as amostras, no geral, diminuíram até o décimo quarto dia, sendo a diminuição mais pronunciada depois do sétimo dia. Depois do décimo quarto dia há uma

tendência para estabilização. A diminuição sugere volatilização de mercúrio e/ou difusão de mercúrio através das paredes do frasco. Vapores de mercúrio foram produzidos pela simples elevação do pH da amostra para 13 usando uma base forte ou TMAH.<sup>50</sup> Perdas de mercúrio também foram detectadas em meio de TMAH por Vieira *et al.*<sup>3</sup> Perda significativa de mercúrio, até 50%, para as amostras estudadas pode ocorrer em vinte e um dias, indicando que a suspensão da amostra em TMAH deve ser preferencialmente analisada imediatamente depois do preparo.



**Figura 12** – Efeito do tempo de repouso sobre o sinal de absorvância normalizado para mercúrio a partir das suspensões dos CRM em TMAH. (—▲—) DOLT-3 7,2  $\mu\text{g L}^{-1}$ , (—●—) BCR 186 6,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  e (—■—) TORT-2 1,3  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

#### 4.2.5. Volume de amostra

O volume de amostra digerida injetado no frasco de reação é de grande importância já que está diretamente relacionado com o limite de detecção. Esse volume foi variado de 1,0 a 5,0 mL e foi possível observar um aumento quase linear do sinal de absorvância com o volume, mostrando um comportamento muito similar àquele observado por Ribeiro *et al.*,

<sup>9</sup> que usou o mesmo sistema de CV AAS deste trabalho para determinar a concentração de mercúrio total em amostras ambientais sólidas preparadas na forma de suspensão em meio ácido. O volume de 3,0 mL foi adotado. Nesta condição, boa sensibilidade e repetitividade são obtidas. Além disso, a mesma sensibilidade é assegurada para os dois procedimentos de determinação usados no presente trabalho, o que é essencial para precisão aceitável da concentração de metilmercúrio.

#### 4.2.6. Especificação

Em trabalho desenvolvido previamente<sup>4</sup> e também por Kaercher *et al.*<sup>15</sup> pôde-se demonstrar que é possível determinar  $\text{Hg}^{2+}$  seletivamente em CRM biológicos tratados com TMAH por CV AAS, mantendo o tubo de quartzo a temperatura ambiente. Nesta condição, não há energia suficiente para clivar a ligação entre Hg e o radical orgânico. Depois disso, a medida das mesmas amostras com o aquecimento do tubo de quartzo em uma chama de acetileno, torna possível a determinação de mercúrio total. Entretanto, o aquecimento do tubo de quartzo diminui consideravelmente a sensibilidade para a determinação de mercúrio total. Uma maneira muito simples de contornar essa limitação é usar um procedimento alternativo para clivar a ligação com o radical orgânico, ao invés de aquecer o tubo, a fim de obter um limite de detecção similar àquele para  $\text{Hg}^{2+}$ . Vários procedimentos com agentes oxidantes são possíveis para oxidação da matriz da amostra e determinação de mercúrio total. Nesta parte do trabalho, digestão ácida das amostras assistida por microondas foi escolhida, permitindo determinar a concentração de mercúrio total com melhor sensibilidade, usando as mesmas condições empregadas para a determinação de  $\text{Hg}^{2+}$ . Além disso, uma estimativa da concentração de metilmercúrio pode ser obtida como a diferença entre as concentrações de mercúrio total e inorgânico, sendo a concentração de mercúrio inorgânico determinada nas amostras tratadas com TMAH.

#### 4.2.7. Parâmetros de mérito

Os parâmetros de mérito para ambos os procedimentos (tratamento com TMAH e digestão ácida) foram obtidos usando soluções aquosas de  $\text{Hg}^{2+}$  em  $\text{HNO}_3$  5,0% v/v. Os limites de detecção (LD) nas amostras tratadas com TMAH apresentam valores comparáveis aos obtidos em meio ácido, como esperado, dado que as determinações foram feitas sob as mesmas condições instrumentais. Os limites de detecção na amostra foram  $0,021 \mu\text{g g}^{-1}$  e  $0,041 \mu\text{g g}^{-1}$  para mercúrio inorgânico e total, respectivamente, visto que a massa de amostra para mercúrio total foi metade daquela para determinação de mercúrio inorgânico. As massas de amostra usadas para calcular os LD para mercúrio total e inorgânico foram 250,0 e 500,0 mg, respectivamente, em um volume final de 25,0 mL.

A sensibilidade obtida para a determinação de Hg total a partir dos CRM digeridos em microondas com o tubo de quartzo a temperatura ambiente foi três vezes melhor que aquela obtida empregando o aquecimento do tubo de quartzo:  $0,029 \text{ s L } \mu\text{g}^{-1}$  contra  $0,010 \text{ s L } \mu\text{g}^{-1}$  com aquecimento. Como consequência, o limite de detecção para mercúrio total melhorou consideravelmente utilizando as amostras digeridas em microondas ao invés do aquecimento do tubo de quartzo. A Tabela 5 apresenta os parâmetros de mérito para a determinação de mercúrio total e inorgânico em CRM tratados com TMAH ou digeridos com ácido.

A digestão ácida dos CRM assistida por microondas para a determinação de mercúrio total possibilitou a construção de uma única curva de calibração, com as soluções padrão em meio de  $\text{HNO}_3$  5,0% v/v, para ambos os procedimentos (tratamento com TMAH ou com ácido), tornando o método ainda mais rápido. Um coeficiente de correlação típico de 0,9999 na curva de calibração foi obtido. Além disso, a etapa de medida de Hg total nos CRM digeridos é mais rápida do que aquela com os mesmos tratados com TMAH com o tubo de quartzo aquecido na chama de ar/acetileno, já que somente o CRM digerido precisa ser pipetado e transferido para o frasco de reação, o qual, depois de cada medida, permanecia muito limpo, em contraste com aquele usado para as suspensões em TMAH.

**Tabela 5** – Figuras de mérito para a determinação de Hg total e inorgânico por CV AAS com e sem o aquecimento do tubo de quartzo.

Solução padrão / Hg <sup>2+</sup>	Chama / Ar/C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	Inclinação / (µg L <sup>-1</sup> ) <sup>-1</sup> s	R	LD / ng g <sup>-1</sup>	Faixa de Calibração / µg L <sup>-1</sup>
HNO <sub>3</sub> 5,0% v/v	Não	0,029	0,9999	21 <sup>a</sup> /41 <sup>b</sup>	3,0 – 15,0
TMAH 1,0% m/v	Não	0,031	0,9983	25	1,0 – 50,0
TMAH 1,0% m/v	Sim	0,010	0,9995	130	1,0 – 50,0

<sup>a</sup> Limite de detecção para Hg<sup>2+</sup>. <sup>b</sup> Limite de detecção para Hg total.

#### 4.2.8. Resultados analíticos

A exatidão dos métodos para a determinação de mercúrio total e inorgânico foi avaliada pela análise de alguns materiais certificados de referência. Os resultados obtidos para mercúrio total, Hg<sup>2+</sup> e CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup> estão apresentados nas Tabelas 6 e 7. Os valores determinados para mercúrio inorgânico concordam com a diferença entre os valores certificados para metilmercúrio e Hg total e com resultados publicados anteriormente, os quais ficaram dentro de um limite de confiança de 95% dos valores certificados ou próximos aos valores informados para os materiais de referência. Essa concordância confirma que o valor obtido por CV AAS depois do tratamento com TMAH corresponde à concentração de Hg<sup>2+</sup>. A concentração de mercúrio orgânico, calculada como a diferença entre os valores obtidos por CV AAS depois da digestão da amostra assistida por microondas e pré-tratamento da amostra com TMAH com e sem aquecimento do tubo de quartzo, também concorda com a concentração de metilmercúrio certificada, de acordo com o teste *t* para um nível de confiança de 95%. Isso sugere que a concentração de mercúrio orgânico obtida pela diferença mencionada é de fato metilmercúrio. Os desvios padrão relativos foram no geral menores que 3,0% para os CRM digeridos e menores do que 6,0% para aqueles tratados com TMAH. Os desvios padrão relativos para os CRM tratados com TMAH sendo o tubo de quartzo aquecido na chama de ar/acetileno foram, em geral,

menores que 10,0%. Neste caso, o limite de detecção para Hg total nas amostras foi de 0,13  $\mu\text{g g}^{-1}$ .

**Tabela 6** – Resultados analíticos para a determinação de Hg total (amostras digeridas em forno de microondas), inorgânico (amostras em TMAH) e metilmercúrio (obtido pela diferença entre Hg total e  $\text{Hg}^{2+}$ ) em CRM por CV AAS. Valores obtidos (média  $\pm$  limite de confiança) em  $\mu\text{g g}^{-1}$ ; n = 3.

	Mercúrio total		Metilmercúrio		Mercúrio inorgânico	
	<b>Certificado</b>	Encontrado	<b>Certificado</b>	Encontrado <sup>a</sup>	<b>Informado<sup>b</sup></b>	Encontrado
BCR 186	<b>1,97 <math>\pm</math> 0,04</b>	2,02 $\pm$ 0,07	<b>NI</b>	0,60 $\pm$ 0,20	<b>1,5 <math>\pm</math> 0,1<sup>c</sup></b>	1,41 $\pm$ 0,26
DOLT-3	<b>3,37 <math>\pm</math> 0,14</b>	3,50 $\pm$ 0,08	<b>1,59 <math>\pm</math> 0,12</b>	1,64 $\pm$ 0,19	<b>1,78</b>	1,86 $\pm$ 0,27
TORT-2	<b>0,27 <math>\pm</math> 0,06</b>	0,30 $\pm$ 0,02	<b>0,152 <math>\pm</math> 0,013</b>	0,166 $\pm$ 0,010	<b>0,118</b>	0,138 $\pm$ 0,030
ERM-CE 278	<b>0,196 <math>\pm</math> 0,009</b>	0,226 $\pm$ 0,036	<b>NI</b>	ND	<b>NI</b>	< LQ

<sup>a</sup> Calculado como a diferença entre Hg total e Hg inorgânico. <sup>b</sup> Calculado como a diferença entre Hg total e  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  como Hg.

<sup>c</sup> Determinado por Torres *et al.* <sup>4</sup>. NI: não informado. ND: não determinado.

**Tabela 7** – Resultados analíticos para a determinação de Hg total (com aquecimento do tubo de quartzo), inorgânico (com o tubo de quartzo a temperatura ambiente) e metilmercúrio (obtido pela diferença entre Hg total e  $\text{Hg}^{2+}$ ) em CRM tratados com TMAH por CV AAS. Valores obtidos (média  $\pm$  desvio padrão) em  $\mu\text{g g}^{-1}$ ;  $n = 3$ .

	Mercúrio total		Metilmercúrio		Mercúrio inorgânico	
	<b>Certificado</b>	Encontrado	<b>Certificado</b>	Encontrado <sup>a</sup>	<b>Informado</b>	Encontrado
BCR 186	<b>1,97 <math>\pm</math> 0,04</b>	2,10 $\pm$ 0,30	<b>NI</b>	0,60 $\pm$ 0,30	<b>NI</b>	1,50 $\pm$ 0,10
DOLT-2	<b>2,14 <math>\pm</math> 0,28</b>	2,21 $\pm$ 0,02	<b>0,693 <math>\pm</math> 0,053</b>	0,72 $\pm$ 0,04	<b>1,45<sup>b</sup></b>	1,49 $\pm$ 0,03
TORT-2	<b>0,27 <math>\pm</math> 0,06</b>	0,27 $\pm$ 0,01	<b>0,152 <math>\pm</math> 0,013</b>	0,14 $\pm$ 0,02	<b>0,118<sup>b</sup></b>	0,13 $\pm$ 0,02
DORM-1	<b>0,798 <math>\pm</math> 0,074</b>	0,226 $\pm$ 0,036	<b>0,731 <math>\pm</math> 0,060</b>	0,64 $\pm$ 0,04	<b>0,129<sup>b</sup></b>	0,16 $\pm$ 0,02
BCR 278	<b>0,196 <math>\pm</math> 0,009</b>	0,18 $\pm$ 0,01	<b>NI</b>	0,09 $\pm$ 0,03	<b>NI</b>	0,09 $\pm$ 0,03
BCR 397	<b>12,3 <math>\pm</math> 0,5</b>	12,5 $\pm$ 0,4	<b>0,87<sup>c</sup></b>	0,60 $\pm$ 0,05	<b>11,5 <math>\pm</math> 0,5</b>	11,9 $\pm$ 0,2
GBW 9101	<b>2,16 <math>\pm</math> 0,21</b>	2,10 $\pm$ 0,10	<b>NI</b>	1,50 $\pm$ 0,10	<b>NI</b>	0,60 $\pm$ 0,04

<sup>a</sup> Calculado como a diferença entre a concentração de Hg total menos a de Hg inorgânico.

<sup>b</sup> Calculado como a diferença entre a concentração de Hg total menos a de  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  como Hg. <sup>c</sup> Valor informado. NI: não informado.



## 5. CONCLUSÕES

São propostos três métodos muito simples e rápidos para a determinação de mercúrio total e inorgânico em CRM biológicos preparados na forma de suspensões por CV AAS. Todos permitem determinar a concentração de metilmercúrio sem manipulação de padrão de metilmercúrio, possibilitando a análise de especiação sem o uso de qualquer técnica cromatográfica. Desta forma os métodos se mostraram adequados para análise rotineira e para determinar a concentração das espécies de mercúrio nas amostras propostas, sem necessidade de pré-concentração.

O método no qual se empregou o tratamento dos CRM com água e oxidação *in situ* com permanganato de potássio provou ser rápido, seguro, ambientalmente correto e confiável para a determinação proposta. O procedimento de preparo de amostra proposto minimiza as chances de contaminação, já que somente água desionizada é usada para preparar a suspensão. A maior vantagem deste procedimento é que somente um mínimo de reagentes e etapas de manipulação da amostra são requeridos. Esse procedimento simples poderia ser útil para análise de rotina ou como um procedimento classificatório de rotina para materiais biológicos.

O procedimento de pré-tratamento da amostra com TMAH promove um método de solubilização simples, seguro, rápido, reprodutivo e efetivo para amostras biológicas. O procedimento proposto para a determinação de mercúrio total a temperatura ambiente, depois da digestão ácida da amostra em forno de microondas, garante um limite de detecção similar àquele obtido para  $\text{Hg}^{2+}$ . A etapa de medida de Hg total nos CRM digeridos é mais rápida do que aquela com os mesmos tratados com TMAH quando o tubo de quartzo é aquecido na chama de ar/acetileno. Além disso a sensibilidade é três vezes menor quando o tubo de quartzo é aquecido na chama de ar/acetileno.

## 6. REFERÊNCIAS

1. M. V. B Krishna; M. Ranjit; D. Karunasagar; J. Arunachalam; A rapid ultrasound-assisted thiourea extraction method for the determination of inorganic and methyl mercury in biological and environmental samples by CV AAS, *Talanta*, 2005, 67, 70-80.
2. E. M. M. Flores; B. Welz; A. J. Curtius; Determination of mercury in mineral coal using cold vapor generation directly from slurries, trapping in a graphite tube, and electrothermal atomization, *Spectrochim. Acta Part B*, 2001, 56, 1605-1614.
3. M.A. Vieira; A. S. Ribeiro; A. J. Curtius; R. E. Sturgeon; Determination of total and methylmercury in biological samples by photochemical vapor generation, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, 388, 837-847.
4. D. P. Torres; M. A. Vieira; A. S. Ribeiro; A. J. Curtius; Determination of inorganic and total mercury in biological samples treated with tetramethylammonium hydroxide by cold vapor atomic absorption spectrometry using different temperatures in the quartz cell, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2005, 20, 289-294.
5. G. Tao; S. N. Willie; R. E. Sturgeon; Determination of total mercury in biological tissues by flow injection cold vapour generation atomic absorption spectrometry following tetramethylammonium hydroxide digestion, *Analyst*, 1998, 123, 1215-1218.
6. G. Tao; S. N. Willie; and R. E. Sturgeon; Determination of inorganic mercury in biological tissues by cold vapor atomic absorption spectrometry following tetramethylammonium hydroxide solubilization, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1999, 14, 1929-1931.
7. M. Ghisi; A. S. Ribeiro; M. A. Vieira; A. J. Curtius; Avaliação de diferentes formas de introdução de amostra biológica tratada com hidróxido de tetrametilamônio em espectrometria de absorção atômica com chama, *Revista Analytica*, 2007, 28, 58-65.
8. H. Matusiewicz; B. Golik; Determination of major and trace elements in biological materials by microwave induced plasma optical emission spectrometry (MIP-OES) following tetramethylammonium hydroxide (TMAH) solubilization, *Microchemical Journal*, 2004, 76, 23-29.
9. A. S. Ribeiro; M. A. Vieira; A. J. Curtius; Slurry sampling for Hg determination in sediments, sewage sludge and coal samples by cold vapor atomic absorption spectrometry, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2004, 15, 825-831.

10. E. J. Santos; A. B. Hermann; M. A. Vieira; V. L. A. Frescura; A. J. Curtius; Evaluation of slurry preparation procedures for the simultaneous determination of Hg and Se in biological samples by axial view ICP OES using on-line chemical vapor generation, *Spectrochim. Acta Part B*, 2005, 60, 659-665.
11. M. Kan; S. N. Willie; C. Scriver; R. E. Sturgeon; Determination of total mercury in biological samples using flow injection CVAAS following tissue solubilization in formic acid, *Talanta*, 2006, 68, 1259-1263.
12. C. Scriver; M. Kan; S. Willie; C. Soo; H. Birnboim; Formic acid solubilization of marine biological tissues for multi-element determination by ETAAS and ICP-AES, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2005, 381, 1460-1466.
13. S. N. Willie; D. C. Grégoire; R. E. Sturgeon; Determination of Inorganic and Total Mercury in Biological Tissues by Electrothermal Vaporization Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, *Analyst*, 1997, 122, 751-754.
14. S. Río-Segade; C. Bendicho; Slurry sampling combined with ultrasonic pretreatment for total mercury determination in samples containing inorganic and methylmercury by flow injection-cold vapor-atomic absorption spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1999, 14, 1907-1912.
15. L. E. Kaercher; F. Goldschmidt; J. N. G. Paniz; E. M. M. Flores; V. L. Dressler; Determination of inorganic and total mercury by vapor generation atomic absorption spectrometry using different temperatures of the measurement cell, *Spectrochim. Acta Part B*, 2005, 60, 705-710.
16. G. A. Zachariadis; A. N. Anthemidis; E. I. Daftsis; J. A. Stratis; On-line speciation of mercury and methylmercury by cold vapour atomic absorption spectrometry using selective solid phase extraction, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2005, 20, 63-65.
17. M. C. R. Rezende; R. C. Campos; A. J. Curtius; Speciation of Mercury in Fish Samples by Solvent Extraction, Methyl-mercury Reduction Directly in the Organic Medium and Cold Vapour Atomic Absorption Spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1993, 8, 247-251.
18. A. M. L. Filho; R. C. Campos; Redução seletiva aplicada à especiação de mercúrio em peixes: uma adaptação do método de Magos, *Quim. Nova*, 1999, 22, 477-482.
19. C. M. Bisinoti; W. F. Jardim; O Comportamento do Metilmercúrio (metilHg) no Ambiente, *Quim. Nova*, 2004, 27, 593-600.
20. F. A. Azevedo; *Toxicologia do mercúrio*, 1ª edição, RiMa, São Carlos, SP, Brasil, 2003.

21. H. Akagi; O. Malm; F. J. P. Branches; Y. Kinjo; Y. Kashima; J. R. D. Guimarães; R. B. Oliveira; K. Haraguchi; W. C. Pfeiffer; Y. Takizawa; H. Kato, Human exposure to mercury due to goldmining in the Tapajós river basin, Amazon, Brazil: speciation of mercury in human hair, blood and urine, *Water, Air, and Soil Pollution*, 1995, 80, 85-94.
22. O. Malm; F. J. P. Branches; H. Akagi; M. B. Castro; W. C. Pfeiffer; M. Harada; W. R. Bastos; H. Kato; Mercury and methylmercury in fish and human hair from the Tapajós river basin, Brazil, *The Science of the Environment*, 1995, 175, 141-150.
23. R. A. Farias; S. Hacon; R. C. Campos; R. Argento; Mercury contamination in farmed fish setup on former garimpo mining areas in the Northern Mato Grosso State, Amazon region, Brazil, *The Science of the Environment*, 2005, 348, 128-134.
24. O. Malm; J. R. D. Guimaraes; M. B. Castro; W. R. Bastos; J. P. Viana; F. J. P. Branches; E. G. Silveira; W. C. Pfeiffer; Follow-up of mercury levels in fish, human hair and urine in the Madeira and Tapajós basins, Amazon, Brazil, *Water, Air, and Soil Pollution*, 1997, 97, 45-51.
25. O. Malm; Gold Mining as a Source of Mercury Exposure in the Brazilian Amazon, *Environmental Research Section A*, 1998, 77, 73-78.
26. H. Akagi; O. Malm; Y. Kinjo; M. Harada; F. J. P. Branches; W. C. Pfeiffer; H. Kato; Methylmercury pollution in the Amazon, Brazil, *The Science of the Environment*, 1995, 175, 85-95.
27. I. Takase; H. B. Pereira; A. Luna, P. Grinberg; R. C. Campos; A geração química de vapor em espectrometria atômica, *Quim. Nova*, 2002, 25, 1132-1144.
28. R. C. C. M. Micaroni; M. I. M. S. Bueno; W. F. Jardim; Compostos de Mercúrio. Revisão de Métodos de Determinação, Tratamento e Descarte, *Quim. Nova*, 2000, 23, 487-495.
29. M. Leermakers; W. Baeyens; P. Quevauviller; M. Horvat; Mercury in environmental samples: Speciation, artifacts and validation, *Trends in Anal. Chem.*, 2005, 24, 383.
30. J. Qvarnström; W. Frech; Mercury species transformations during sample pre-treatment of biological tissues studied by HPLC-ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2002, 17, 1486-1491.
31. A. C. P. Monteiro; L. S. N. Andrade; A. S. Luna; R. C. Campos; Sequential quantification of methyl mercury in biological materials by selective reduction in the presence of mercury(II), using two gas-liquid separators, *Spectrochim. Acta Part B*, 2002, 57, 2103-2112.

32. S. Gil; I. Lavilla; C. Bendicho; Ultrasound-Promoted Cold Vapor Generation in the Presence of Formic Acid for Determination of Mercury by Atomic Absorption Spectrometry, *Anal. Chem.*, 2006, 78, 6260-6264.
33. A. S. Ribeiro; M. A. Vieira; S. Willie; R. E. Sturgeon; Ultrasound-assisted vapor generation of mercury, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, 388, 849-857.
34. C. Zheng; Y. Li; Y. He; Q. Ma; X. Hou; Photo-assisted chemical vapor generation with formic acid for ultrasensitive atomic fluorescence spectrometric determination of mercury: potential application to mercury speciation in water, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2005, 40, 746-750.
35. R. Figuera; M. Garcia; I. Lavilla; C. Bendicho; Photoassisted vapor generation in the presence of organic acids for ultrasensitive determination of Se by electrothermal-atomic absorption spectrometry following headspace single-drop microextraction, *Spectrochim. Acta Part B*, 2005, 60, 1556-1563.
36. X. Guo; R. E. Sturgeon; Z. Mester; G. J. Gardner; Vapor Generation by UV Irradiation for Sample Introduction with Atomic Spectrometry, *Anal. Chem.*, 2004, 76, 2401-2405.
37. W. B. Robbins; J. A. Caruso; Development of hydride generation methods for atomic spectroscopic analysis, *Anal. Chem.*, 1979, 51, A889.
38. A. D'Ulivo; Z. Mester; R. E. Sturgeon; The mechanism of formation of volatile hydrides by tetrahydroborate(III) derivatization: A mass spectrometric study performed with deuterium labeled reagents, *Spectrochim. Acta Part B*, 2005, 60, 423-438.
39. A. D'Ulivo; M. Onor; E. Pitzalis; Role of Hydroboron Intermediates in the Mechanism of Chemical Vapor Generation in Strongly Acidic Media, *Anal. Chem.*, 2004, 76, 6342-6352.
40. B. Welz; M. Sperling; *Atomic Absorption Spectrometry*, Wiley-VCH, Weinheim, 1999.
41. D. Tsalev; M. Sperling; B. Welz; On-line Microwave Sample Pre-treatment for Hydride Generation and Cold Vapour Atomic Absorption Spectrometry. Part 1. The Manifold, *Analyst*, 1992, 117, 1729-1733.
42. D. Tsalev; M. Sperling; B. Welz; On-line Microwave Sample Pre-treatment for Hydride Generation and Cold Vapour Atomic Absorption Spectrometry. Part 2. Chemistry and Applications, *Analyst*, 1992, 117, 1735-1741.

43. U. Tinggi; G. Craven; Determination of Total Mercury in Biological Materials by Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry After Microwave Digestion, *Microchemical Journal*, 1996, 54, 168-173.
44. M. S. Jimenez; R. E. Sturgeon; Speciation of Methyl- and Inorganic Mercury in Biological Tissues Using Ethylation and Gas Chromatography With Furnace Atomization Plasma Emission Spectrometric Detection, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1997, 12, 597-601.
45. I. Serafimovski; I. Karadjova; T. Stafilov; J. Cvetkovic; Determination of inorganic and methylmercury in fish by cold vapor atomic absorption spectrometry and inductively coupled plasma atomic emission spectrometry, *Microchemical Journal*, 2008, 89, 42-47.
46. L. Yang; Z. Mester; R. E. Sturgeon; Determination of methylmercury in fish tissues by isotope dilution SPME-GC-ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2003, 18, 431-436.
47. V. Krivan; H. F. Haas; Prevention of loss of mercury (II) during storage of dilute solutions in various containers, *Fres. J. Anal. Chem.*, 1988, 332, 1-6.
48. J. L. Parker; N. S. Bloom; Preservation and storage techniques for low-level aqueous mercury speciation, *Science of the Total Environment*, 2005, 337, 253-263.
49. D. P. Torres; M. A. Vieira; A. S. Ribeiro; A. J. Curtius; Slurry Sampling for Arsenic Determination in Sediments by Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2007, 18, 728-732.
50. E. J. Santos; A. B. Herrmann; V. L. A. Frescura; R. E. Sturgeon; A. J. Curtius; A novel approach to cold vapor generation for the determination of mercury in biological samples, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2008, 19, 929-934.

## 7. ANEXOS: Artigos

**Determination of inorganic and total mercury in biological samples treated with tetramethylammonium hydroxide by cold vapor atomic absorption spectrometry using different temperatures in the quartz cell**

Daiane Placido Torres, Mariana A. Vieira, Anderson S. Ribeiro and Adilson José Curtius;  
*J. Anal. Atom. Spectrom.*, 2005, 20, 289-294.

**A novel, simple and fast approach for the determination of inorganic and total mercury in aqueous slurries of biological samples using cold vapor atomic absorption spectrometry and *in situ* oxidation**

Daiane Placido Torres, Daniel L. G. Borges, Vera L. A. Frescura and Adilson José Curtius;  
*J. Anal. Atom. Spectrom.*, 2009, *No Prelo*.

**Simple mercury speciation in biological samples by CV AAS following microwave or TMAH pre-treatment**

Daiane Placido Torres, Vera L. A. Frescura and Adilson José Curtius;  
Em preparação.